

Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System

Esperimenti con curva standard



Applied Biosystems StepOne™

Sistema PCR Real-Time

Esperimenti con curva standard

Introduzione

1

Disegno
dell'esperimento

2

Preparazione delle
reazioni

3

Esecuzione
dell'esperimento

4

Analisi
dell'esperimento

5

© Copyright 2006, 2010 Applied Biosystems. All rights reserved.

Information in this document is subject to change without notice. Applied Biosystems assumes no responsibility for any errors that may appear in this document.

APPLIED BIOSYSTEMS DISCLAIMS ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL APPLIED BIOSYSTEMS BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

NOTICE TO PURCHASER: Label License

The StepOne™ Real-Time PCR System is covered by US patents and corresponding claims in their non-US counterparts, owned by Applied Biosystems. No right is conveyed expressly, by implication, or by estoppel under any other patent claim, such as claims to apparatus, reagents, kits, or methods such as 5' nuclease methods. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

TRADEMARKS:

Applera, Applied Biosystems, AB (Design), MicroAmp, Primer Express, and VIC are registered trademarks, and FAM, JOE, ROX, StepOne, and TAMRA are trademarks of Applied Biosystems o le sue società controllate negli U.S.A. e/o altri paesi.

AmpErase, AmpliTaq Gold, and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

Macintosh is a registered trademark of Apple Computer, Inc.

Microsoft and Windows are registered trademarks of Microsoft Corporation.

All other trademarks are the sole property of their respective owners.

N. di cat. 4377735 Rev. B
06/2010

	Premessa	vii
	Come utilizzare questa guida	vii
	Come ottenere ulteriori informazioni	viii
	Come ottenere assistenza	x
	Convenzioni sulla sicurezza utilizzate in questo documento	xi
	Simboli sugli strumenti	xiii
	Etichette di sicurezza sugli strumenti	xv
	Sicurezza generale dello strumento	xvi
	Sicurezza dalle sostanze chimiche	xvii
	Sicurezza dei rifiuti chimici	xix
	Sicurezza elettrica	xx
	Sicurezza LED	xxi
	Sicurezza rischio biologico	xxi
	Sicurezza della stazione di lavoro	xxii
	Norme disicurezza e di Compatibilità Elettromagnetica (EMC)	xxiii
Capitolo 1	Introduzione	1
	Informazioni sul sistema StepOne™	2
	Informazioni sugli esperimenti con curva standard	4
	Come utilizzare questa guida	7
	Informazioni sull'esperimento di esempio	8
	Flusso di lavoro dell'esperimento di esempio	9
Capitolo 2	Disegno dell'esperimento	11
	Descrizione generale	12
	Creazione di un nuovo esperimento	13
	Definizione delle proprietà dell'esperimento	16
	Definizione dei metodi e dei materiali	18
	Impostazione dei target	20
	Impostazione degli standard	22
	Impostazione dei campioni	25
	Impostazione del metodo di esecuzione	27
	Verifica dell'impostazione della reazione	29
	Ordinazione dei materiali per l'esperimento	35
	Termine del flusso di lavoro del Design Wizard	38

Capitolo 3	Preparazione delle reazioni	41
	Descrizione generale	42
	Preparazione delle diluizioni del campione	43
	Preparazione delle serie di diluizioni standard	45
	Preparazione della miscela di reazione	47
	Preparazione della piastra di reazione	50
Capitolo 4	Esecuzione dell'esperimento	53
	Descrizione generale	54
	Preparazione per l'esecuzione	55
	(Opzionale) Abilitazione delle notifiche	57
	Avvio dell'esecuzione	59
	Monitoraggio dell'esecuzione	62
	Download della piastra di reazione e trasferimento dei dati	71
Capitolo 5	Analisi dell'esperimento	75
	Descrizione generale	76
	Sezione 5.1: Verifica dei risultati	77
	Analisi dell'esperimento	78
	Visualizzazione della curva standard	84
	Visualizzazione del plot di amplificazione	87
	Visualizzazione della tabella dei pozzetti	92
	Pubblicazione dei dati	95
	Sezione 5.2: Risoluzione problemi (se necessario)	97
	Visualizzazione delle impostazioni di analisi	98
	Visualizzazione del riepilogo QC	100
	Omissione di pozzetti dall'analisi	102
	Visualizzazione del plot multicomponente	104
	Visualizzazione del plot dei dati non elaborati	106
Appendice A	Ulteriori flussi di lavoro degli esperimenti	109
	Flusso di lavoro impostazione avanzata	110
	Flusso di lavoro avvio rapido	111
	Flusso di lavoro del templatato	112
	Flusso di lavoro esportazione/importazione	113

Bibliografia	115
Glossario	117
Indice	131

Come utilizzare questa guida

- Scopo della guida** Questa guida spiega come eseguire esperimenti con curva standard sul sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (sistema StepOne™). Questa guida funge da:
- Tutorial, utilizzando i dati dell'esperimento di esempio in dotazione con il software del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR (software StepOne™).
 - Guida, per i propri esperimenti.
- A chi si rivolge** Questa guida è pubblicata per il personale di laboratorio e per i ricercatori principali che eseguono esperimenti con curva standard con il sistema StepOne.
- Ipotesi assunte** La guida prevede che l'utente:
- Abbia conoscenze sull'utilizzo del sistema operativo Microsoft Windows® XP.
 - Abbia conoscenze sull'utilizzo di Internet e sui browser di navigazione in Internet.
 - Conosca le modalità di manipolazione dei campioni DNA e/o RNA e della loro preparazione per la PCR.
 - Abbia dimestichezza con la memorizzazione dei dati, il trasferimento di file e le funzioni di copia e incolla.
 - Abbia esperienza di collegamenti in rete, nel caso sia prevista l'integrazione del sistema StepOne nel flusso di lavoro preesistente del proprio laboratorio.
- Convenzioni del testo** La guida utilizza le seguenti convenzioni:
- Il testo in **Grassetto** indica un'azione dell'utente. Ad esempio:
Digitare **0**, quindi premere **Enter (Invio)** per ognuno dei campi rimanenti.
 - Il testo in *Corsivo* indica parole nuove o importanti e viene utilizzato anche per enfatizzare. Ad esempio:
Prima di un'analisi, preparare *sempre* matrice fresca.
 - Un simbolo di freccia a destra (▶) separa i comandi successivi selezionati da un menu a discesa o da un menu a scelta rapida. Ad esempio:
Selezionare **File ▶ Open (Apri)**.

Messaggi di attenzione per l'utente

Nella documentazione per l'utente Applied Biosystems compaiono due tipi di messaggi di attenzione. Ciascun messaggio presuppone un particolare livello di osservanza o l'esecuzione di una particolare operazione da parte dell'utente, secondo quanto descritto qui di seguito:

Nota: – Fornisce informazioni che potrebbero essere di interesse o di aiuto ma non di importanza critica per l'uso del prodotto.

IMPORTANTE! – Fornisce informazioni necessarie per il corretto funzionamento dello strumento, per l'uso accurato del kit reagenti o per l'uso sicuro di un prodotto chimico.

Alcuni esempi dei messaggi di attenzione sono indicati qui di seguito:

Nota: La funzione Calibrate (Calibra) è anche disponibile nella Control Console (Console di comando)

IMPORTANTE! Per verificare la propria connessione client, è necessario un ID utente valido.

Messaggi di sicurezza

Nella documentazione per l'utente appaiono anche Messaggi di sicurezza. Per ulteriori informazioni, consultare [“Messaggi di sicurezza”](#) a pagina xi.

Come ottenere ulteriori informazioni

Documentazione correlata

La documentazione seguente viaggia insieme al sistema StepOne:

Documento	n. di cat. inglese	n. di cat. italiano
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments</i>	4376786	4377729
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments</i>	4376787	—
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments</i>	4376785	4377742
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Standard Curve Experiments</i>	4376784	4377736
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation, Maintenance, and Networking Guide</i>	4376782	4377798
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Quick Reference Card</i>	4376783	4377792
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Site Preparation Guide</i>	4376768	4378359
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software Help</i>	—	—

La documentazione di supporto seguente è disponibile presso Applied Biosystems:

Documento	n. di cat.
<i>Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays Application Note</i>	127AP05
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Performance Verification Protocol</i>	4376791
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Installation Qualification-Operation Qualification Protocol</i>	4376790
<i>Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Planned Maintenance Protocol</i>	4376788
<i>Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4334429
<i>Primer Express® Software Version 3.0 Getting Started Guide</i>	4362460
<i>TaqMan® Gene Expression Assays Protocol</i>	4333458
<i>User Bulletin #2: Relative Quantitation of Gene Expression</i>	4303859

Nota: Per ulteriori documentazioni, consultare “[Come ottenere assistenza](#)” a [pagina x](#).

Informazioni dalla GuidaSoftware (Help)

La voce Help (Guida) del Software StepOne descrive le modalità di utilizzo di ogni funzione dell'interfaccia utente. Accedere alla voce Help (Guida) dal software StepOne in uno dei modi seguenti:

- Premere **F1**.
- Fare clic su  nella barra degli strumenti.
- Selezionare **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

Per trovare argomenti di interesse nella voce Help (Guida):

- Esaminare l'indice.
- Cercare un argomento specifico.
- Cercare un indice alfabetico.

Invio di commenti

Applied Biosystems è ben lieta di ricevere i commenti e i suggerimenti dei clienti allo scopo di migliorare la propria documentazione per l'utente. È possibile inviare commenti per e-mail a:

techpubs@appliedbiosystems.com

IMPORTANTE! Utilizzare l'indirizzo e-mail sopra indicato esclusivamente per inoltrare commenti e suggerimenti relativi alla documentazione. Per ordinare documenti, scaricare file PDF o per aiuto su questioni tecniche, visitare il sito web all'indirizzo **<http://www.appliedbiosystems.com>**, quindi fare clic sul link **Support..** (Vedere “[Come ottenere assistenza](#)” qui di seguito).

Come ottenere assistenza

Per le informazioni relative a servizi e assistenza tecnica più recenti per tutte le sedi, visitare il sito web all'indirizzo <http://www.appliedbiosystems.com>, quindi fare clic sul link **Support (assistenza)**.

Nella pagina dell'assistenza clienti, è possibile:

- Ricercare argomenti attraverso le domande frequenti (FAQ)
- Inviare una domanda direttamente al servizio di assistenza tecnica
- Ordinare documenti per l'utente Applied Biosystems, MSDS, certificati di analisi e altri documenti correlati
- Scaricare documenti in PDF
- Ottenere informazioni sull'addestramento del cliente
- Scaricare aggiornamenti e patch del software

Inoltre, la pagina dell'assistenza clienti fornisce l'accesso ai numeri di telefono e di fax in tutto il mondo per contattare l'assistenza tecnica e i punti vendita Applied Biosystems.

IMPORTANTE! Contattare il Servizio clienti Applied Biosystems (Customer Care Center) quando suggerito da questa guida o in caso di necessità per programmare le operazioni di manutenzione (quali, manutenzione pianificata annuale o verifica/calibrazione della temperatura) per il proprio strumento StepOne™. Per ottenere un numero di telefono o un indirizzo e-mail del centro, andare su <http://www.appliedbiosystems.com/support/contact>.

Convenzioni sulla sicurezza utilizzate in questo documento

Messaggi di sicurezza Nella documentazione per l'utente di Applied Biosystems appaiono quattro diversi messaggi di attenzione in punti del documento dove risulta necessario essere ben consapevoli della possibilità di pericoli rilevanti. Ciascun messaggio- **IMPORTANTE**, **ATTENZIONE**, **AVVERTENZA**, **PERICOLO**- presuppone un particolare livello di osservanza o l'esecuzione di una particolare operazione da parte dell'utente, secondo quanto descritto qui di seguito.

Definizioni

IMPORTANTE! – Indica informazioni necessarie per il corretto funzionamento dello strumento, per l'uso accurato del kit reagenti o per l'uso sicuro di un prodotto chimico.

 **ATTENZIONE** – Indica una situazione potenzialmente pericolosa che, se non evitata, potrebbe causare lesioni di minore o moderata entità. Può inoltre essere utilizzata per mettere in guardia l'utente nei confronti di pratiche non sicure.

 **AVVERTENZA** – Indica una situazione potenzialmente pericolosa che, se non evitata, potrebbe causare lesioni gravi o morte.

 **PERICOLO** – Indica una situazione di pericolo imminente che, se non evitata, causerà morte o lesioni gravi. Questo messaggio viene utilizzato esclusivamente nelle situazioni di estremo pericolo.

Ad eccezione di **IMPORTANTE**, ogni messaggio di sicurezza in un documento Applied Biosystems appare accanto a un figura di triangolo aperto contenente un simbolo di pericolo. Questi simboli di pericolo sono identici a quelli posizionati sugli strumenti Applied Biosystems (vedere “[Simboli di sicurezza](#)” a [pagina xiii](#)).

Esempi

IMPORTANTE! Creare un foglio elettronico separato di immissione campioni per ogni piastra a 96-pozzetti.



ATTENZIONE

PERICOLO CHIMICO. TaqMan® Universal PCR Master Mix può provocare irritazione degli occhi e della pelle. L'esposizione può provocare problemi in caso di ingestione o inalazione. Leggere la scheda di sicurezza dei materiali (MSDS) e attenersi rigorosamente alle istruzioni relative alla manipolazione di questa sostanza. Indossare un'adeguata protezione oculare, indumenti e guanti di protezione.



AVVERTENZA

PERICOLO DI INFORTUNIO. Durante il funzionamento dello strumento, il pannello di copertura e il blocco campione riscaldato possono raggiungere temperature che superano anche i 100 °C.



PERICOLO

PERICOLO ELETTRICO. La continuità del circuito di messa a terra è vitale per il funzionamento in sicurezza. Non mettere mai in funzione il sistema con il conduttore di messa a terra scollegato.

Simboli sugli strumenti

Simboli elettrici sugli strumenti

La seguente tabella descrive i simboli elettrici che potrebbero essere visualizzati sugli strumenti Applied Biosystems.

Simbolo	Descrizione	Simbolo	Descrizione
	Indica che l'interruttore di alimentazione dell'apparecchiatura è in posizione On (Acceso).		Indica che un terminale può essere collegato alla messa a terra di un altro strumento. Non si tratta di un terminale di terra protetto.
	Indica che l'interruttore di alimentazione dell'apparecchiatura è in posizione Off (Spento).		Indica un terminale di terra protetto che va collegato a terra prima di eseguire qualsiasi altro collegamento elettrico all'apparecchiatura.
	Indica un interruttore di standby mediante il quale lo strumento viene commutato in una condizione di Standby . Se questo interruttore si trova in standby, potrebbe svilupparsi una tensione pericolosa.		Indica un terminale che può ricevere o erogare corrente o tensione alternata.
	Indica le posizioni On/Off (Acceso/Spento) dell'interruttore di alimentazione a pulsante dell'apparecchiatura.		Indica un terminale che può ricevere o erogare corrente o tensione continua.

Simboli di sicurezza

La seguente tabella descrive i simboli di sicurezza che potrebbero essere visualizzati sugli strumenti Applied Biosystems. Ogni simbolo potrebbe apparire da solo o con un testo che spieghi il pericolo rilevante (vedere [“Etichette di sicurezza sugli strumenti”](#) a pagina xv). Questi simboli di sicurezza potrebbero inoltre apparire vicino alle indicazioni di PERICOLO, AVVERTENZA e ATTENZIONE riscontrabili nel testo dei documenti di supporto-di questo e di altri prodotti.

Simbolo	Descrizione	Simbolo	Descrizione
	Rimanda alla consultazione del manuale per ottenere ulteriori informazioni e chiede all'utente di procedere con la giusta cautela.		Indica la presenza di parti in movimento e chiede all'utente di procedere con la giusta cautela.
	Indica la presenza pericolosa di superfici calde o di altre condizioni di alta-temperatura e chiede all'utente di procedere con la giusta cautela.		Indica la presenza di pericolo di folgorazione e chiede all'utente di procedere con la giusta cautela.
			Indica la presenza di un laser all'interno dello strumento e chiede all'utente di procedere con la giusta cautela.

Simboli ambientali sugli strumenti

I seguenti simboli sono applicabili a tutti i prodotti elettrici ed elettronici Applied Biosystems presenti sul mercato europeo dopo il 13 agosto 2005.

Simbolo	Descrizione
	<p>Non eseguire lo smaltimento di questo prodotto come rifiuto urbano indifferenziato. Seguire le ordinanze locali per i rifiuti urbani per uno smaltimento corretto, allo scopo di ridurre l'impatto ambientale delle apparecchiature elettriche ed elettroniche fuori uso (WEEE).</p> <p>Clienti dell'Unione europea: Contattare l'ufficio di Assistenza Clienti Applied Biosystems locale per la raccolta e il riciclo dell'apparecchiatura. Consultare il sito web http://www.appliedbiosystems.com per un elenco degli uffici di Assistenza Clienti presenti nell'Unione europea.</p>

Etichette di sicurezza sugli strumenti

Le seguenti dichiarazioni di ATTENZIONE, AVVERTENZA e PERICOLO potrebbero essere visualizzabili sugli strumenti Applied Biosystems in combinazione con i simboli di sicurezza descritti nella sezione precedente.

Inglese	Francese
CAUTION Hazardous chemicals. Read the Material Safety Data Sheets (MSDSs) before handling.	ATTENTION Produits chimiques dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels avant la manipulation des produits.
CAUTION Hazardous waste. Refer to MSDS(s) and local regulations for handling and disposal.	ATTENTION Déchets dangereux. Lire les fiches techniques de sûreté de matériels et la réglementation locale associées à la manipulation et l'élimination des déchets.
CAUTION Hot surface.	ATTENTION Surface brûlante.
DANGER High voltage.	DANGER Haute tension.
WARNING To reduce the chance of electrical shock, do not remove covers that require tool access. No user-serviceable parts are inside. Refer servicing to Applied Biosystems qualified service personnel.	AVERTISSEMENT Pour éviter les risques d'électrocution, ne pas retirer les capots dont l'ouverture nécessite l'utilisation d'outils. L'instrument ne contient aucune pièce réparable par l'utilisateur. Toute intervention doit être effectuée par le personnel de service qualifié de Applied Biosystems.
CAUTION Moving parts.	ATTENTION Parties mobiles.
DANGER Class 3B (III) visible and/or invisible LED radiation present when open and interlocks defeated. Avoid exposure to beam.	DANGER Rayonnement visible ou invisible d'un faisceau LED de Classe 3B (III) en cas d'ouverture et de neutralisation des dispositifs de sécurité. Evitez toute exposition au faisceau.

Posizione delle avvertenze

Il sistema StepOne presenta un'avvertenza nella posizione indicata qui di seguito:



Sicurezza generale dello strumento



AVVERTENZA

PERICOLO DI INFORTUNIO. Utilizzando lo strumento in un modo non specificato da Applied Biosystems potrebbero verificarsi lesioni personali o danni allo strumento.

Spostamento e sollevamento dello strumento



ATTENZIONE

PERICOLO DI INFORTUNIO. Lo strumento deve essere spostato e posizionato esclusivamente dal personale o del venditore specificato nella guida applicabile di preparazione della sede. In caso di sollevamento o di spostamento dello strumento dopo la sua avvenuta installazione, non tentare di sollevare o di spostare lo strumento senza l'assistenza di terzi, l'uso di una idonea apparecchiatura per lo spostamento e tecniche corrette di sollevamento. Il sollevamento senza le opportune precauzioni può provocare traumi dorsali dolorosi e permanenti. A seconda del peso, lo spostamento o il sollevamento di uno strumento può richiedere la presenza di due o più persone.

Spostamento e sollevamento dei Computer e Monitor indipendenti



AVVERTENZA

Non tentare di sollevare o di spostare il computer o il monitor senza l'assistenza di terzi. A seconda del peso del computer e/o del monitor, il loro spostamento può richiedere la presenza di due o più persone.

Considerazioni prima del sollevamento del computer e/o del monitor:

- Accertarsi di avere una presa comoda e sicura sul computer o sul monitor durante il sollevamento.
- Accertarsi che il percorso di spostamento dal punto di partenza al punto di arrivo sia libero da eventuali ostacoli.
- Non sollevare un oggetto e contemporaneamente ruotare il busto.
- Mantenere la colonna vertebrale in una corretta posizione neutra mentre si esegue il sollevamento con le gambe.
- I partecipanti devono coordinare le proprie azioni di sollevamento e spostamento prima di cominciare il trasporto.
- Invece di sollevare l'oggetto dalla confezione, ribaltare con attenzione la scatola su un lato e reggerla mentre qualcun altro fa scivolare il contenuto al di fuori di essa.

Messa in funzione dello strumento

Accertarsi che chiunque utilizzi lo strumento abbia:

- ricevuto tutte le istruzioni sulle pratiche di sicurezza generali per i laboratori e su quelle specifiche per lo strumento;
- letto con attenzione tutte le informazioni contenute in tutte le MSDS pertinenti. Vedere [“Schede di sicurezza dei materiali”](#) a pagina xviii.

Pulizia o decontaminazione dello strumento



ATTENZIONE

Prima di utilizzare un metodo di pulizia o di decontaminazione diverso da quelli raccomandati dalla ditta produttrice, verificare con la ditta stessa che il metodo proposto non danneggerà l'apparecchiatura.

Sicurezza dalle sostanze chimiche

Avvertenze relative alle sostanze chimiche pericolose



AVVERTENZA

PERICOLO CHIMICO. Prima di manipolare eventuali sostanze chimiche, fare riferimento alla scheda di sicurezza dei materiali (MSDS) fornita dalla ditta produttrice e osservare tutte le relative precauzioni.



AVVERTENZA

PERICOLO STOCCAGGIO CHIMICO. Non raccogliere o riporre mai i rifiuti chimici in contenitori di vetro, che potrebbero incrinarsi o frantumarsi. I flaconi dei reagenti e delle sostanze chimiche di rifiuto possono essere soggetti a incrinature e a perdite. Tutti i flaconi contenenti sostanze di rifiuto vanno posti in contenitori di sicurezza in polietilene a bassa densità, con il coperchio ben chiuso e le maniglie bloccate in posizione verticale. Durante la manipolazione dei flaconi dei reagenti e delle sostanze chimiche di rifiuto, indossare occhiali di protezione, guanti e indumenti protettivi.

Linee guida di sicurezza chimica

Per ridurre al minimo i pericoli relativi alle sostanze chimiche:

- Leggere con attenzione le informazioni contenute nelle MSDS fornite dalla ditta produttrice delle sostanze chimiche o dei materiali pericolosi, prima di riporli in magazzino, manipolarli o utilizzarli. (Vedere la sezione “[Schede di sicurezza dei materiali](#)” a [pagina xviii](#)).
- Ridurre al minimo il contatto con le sostanze chimiche. Durante la manipolazione dei rifiuti chimici, indossare gli opportuni corredi di protezione personale (ad esempio occhiali di protezione, guanti o indumenti protettivi). Per ulteriori linee guida relative alla sicurezza, consultare le MSDS.
- Ridurre al minimo l'inalazione delle sostanze chimiche. Non lasciare aperti i contenitori delle sostanze chimiche e utilizzare tali sostanze solo in ambienti adeguatamente ventilati (ad esempio, cappa di aspirazione). Per ulteriori linee guida relative alla sicurezza, consultare le MSDS.
- Verificare regolarmente l'eventuale presenza di perdite o versamenti. In caso di perdite o versamenti, attenersi alle procedure per la pulizia delineate dalla ditta produttrice della sostanza chimica in questione nella relativa scheda di sicurezza dei materiali.
- Rispettare tutte le leggi e le norme locali, regionali/provinciali e statali relative alla conservazione, alla manipolazione e allo smaltimento delle sostanze chimiche.

Schede di sicurezza dei materiali

Le ditte produttrici di sostanze chimiche forniscono le schede MSDS nelle spedizioni di sostanze chimiche pericolose ai *nuovi* clienti. Forniscono inoltre le MSDS al cliente alla prima spedizione di una sostanza chimica pericolosa di cui è stato sviluppato un aggiornamento delle MSDS. Le MSDS forniscono all'utente le informazioni di sicurezza necessarie per la conservazione, la manipolazione, il trasporto e lo smaltimento sicuri delle sostanze chimiche.

Qualora, alla consegna di un lotto di sostanze chimiche pericolose si riceva una scheda MSDS aggiornata, accertarsi di sostituirla a quella in archivio.

Come ottenere le schede di sicurezza

Le schede di sicurezza delle sostanze chimiche fornite da Applied Biosystems sono disponibili gratuitamente 24 ore al giorno. Per ottenere le schede di sicurezza:

1. Visitare il sito web <https://docs.appliedbiosystems.com/msdssearch.html>
2. Nel campo Search (Ricerca) della pagina MSDS Search (Ricerca MSDS):
 - a. Digitare il nome, il numero di codice o altre informazioni relativi alla sostanza chimica che si pensa sia presente nel MSDS di interesse.
 - b. Selezionare la lingua desiderata.
 - c. Fare clic su **Search (Ricerca)**.
3. Per visualizzare, scaricare o stampare il documento di interesse:
 - a. Fare clic con il pulsante destro sul titolo del documento.
 - b. Selezionare:
 - **Open (Apri)** – Per visualizzare il documento
 - **Save Target As (Salva oggetto con nome)** – Per scaricare una versione PDF del documento in una destinazione da scegliere
 - **Print Target (Stampa destinazione)** – Per stampare il documento
4. Per ottenere la copia di una scheda di sicurezza inviata via fax o via e-mail, nella pagina Search Results (Risultati ricerca):
 - a. Selezionare **Fax** o **E-mail** sotto al titolo del documento.
 - b. Fare clic su **RETRIEVE DOCUMENTS (RECUPERA DOCUMENTI)** al termine dell'elenco dei documenti.
 - c. Immettere le informazioni richieste.
 - d. Fare clic su **View/Deliver Selected Documents Now (Visualizza/Consegna i documenti selezionati adesso)**.

Nota: Per la MSDS di una sostanza chimica non distribuita da Applied Biosystems, contattare la ditta produttrice della sostanza.

Sicurezza dei rifiuti chimici

Pericolo rifiuti chimici



ATTENZIONE

RIFIUTI PERICOLOSI. Fare riferimento alle MSDS e ai regolamenti locali per la manipolazione e lo smaltimento.



AVVERTENZA

PERICOLO RIFIUTI CHIMICI. I rifiuti generati dagli strumenti Applied Biosystems sono potenzialmente pericolosi e possono provocare lesioni, malattie o morte.



AVVERTENZA

PERICOLO STOCCAGGIO CHIMICO. Non raccogliere o riporre mai i rifiuti chimici in contenitori di vetro, che potrebbero incrinarsi o frantumarsi. I flaconi dei reagenti e delle sostanze chimiche di rifiuto possono essere soggetti a incrinature e a perdite. Tutti i flaconi contenenti sostanze di rifiuto vanno posti in contenitori di sicurezza in polietilene a bassa densità, con il coperchio ben chiuso e le maniglie bloccate in posizione verticale. Durante la manipolazione dei flaconi dei reagenti e delle sostanze chimiche di rifiuto, indossare occhiali di protezione, guanti e indumenti protettivi.

Linee guida di sicurezza per i rifiuti chimici

Per ridurre al minimo i pericoli relativi ai rifiuti chimici:

- Prima di riporre in magazzino, manipolare o smaltire rifiuti chimici, leggere con attenzione le informazioni contenute nelle schede di sicurezza dei materiali fornite dalle ditte produttrici delle sostanze chimiche presenti nel contenitore dei rifiuti.
- Avere a disposizione contenitori per rifiuti primari e secondari. (Un contenitore per rifiuti primario trattiene i rifiuti nell'immediato. Un contenitore secondario trattiene le eventuali perdite o versamenti provenienti dal contenitore primario. Ambedue i contenitori devono essere compatibili con i materiali di rifiuto e rispondere ai requisiti nazionali, regionali e locali per la conservazione in contenitori.)
- Ridurre al minimo il contatto con le sostanze chimiche. Durante la manipolazione dei rifiuti chimici, indossare gli opportuni corredi di protezione personale (ad esempio occhiali di protezione, guanti o indumenti protettivi). Per ulteriori linee guida relative alla sicurezza, consultare le MSDS.
- Ridurre al minimo l'inalazione delle sostanze chimiche. Non lasciare aperti i contenitori delle sostanze chimiche e utilizzare tali sostanze solo in ambienti adeguatamente ventilati (ad esempio, cappa di aspirazione). Per ulteriori linee guida relative alla sicurezza, consultare le MSDS.
- Manipolare i rifiuti chimici all'interno di una cappa di aspirazione.
- Dopo avere svuotato un contenitore dei rifiuti, chiuderlo ermeticamente con il tappo in dotazione.
- Smaltire il contenuto della vaschetta e del flacone dei rifiuti in osservanza delle prassi di sicurezza di laboratorio e delle norme locali, regionali/provinciali e statali relative alla tutela dell'ambiente e della salute.

Smaltimento dei rifiuti

Nel caso durante il funzionamento dello strumento si sviluppino rifiuti potenzialmente pericolosi, è necessario:

- Caratterizzare (se necessario, anche tramite analisi) i rifiuti generati dalle applicazioni, dai reagenti e dai substrati utilizzati nel laboratorio.
- Tutelare la salute e la sicurezza di tutto il personale di laboratorio.
- Verificare che i rifiuti generati dallo strumento vengano conservati, trasferiti, trasportati e smaltiti in conformità a tutte le norme locali, regionali/provinciali e/o statali vigenti.

IMPORTANTE! I materiali radioattivi o a rischio biologico possono richiedere speciali tecniche di manipolazione ed essere soggetti a limitazioni relative allo smaltimento.

Sicurezza elettrica



PERICOLO

PERICOLO DI FOLGORAZIONE. Sono possibili gravi folgorazioni qualora si utilizzi il sistema StepOne senza i pannelli di copertura in posizione. Non rimuovere i pannelli di copertura dello strumento. Quando i pannelli dello strumento sono rimossi, vengono esposti contatti ad alta tensione.

Fusibili



AVVERTENZA

PERICOLO DI INCENDIO. L'uso di fusibili non idonei o di un'alimentazione ad alta tensione non corretta può danneggiare il sistema di cablaggio dello strumento, provocando un incendio. Prima di accendere lo strumento, verificare che i fusibili siano installati correttamente e che la tensione dello strumento corrisponda all'alimentazione presente in laboratorio.



AVVERTENZA

PERICOLO DI INCENDIO. Per una protezione continua contro il rischio di incendio, sostituire i fusibili esclusivamente con fusibili del tipo e dell'ampereaggio specifici per lo strumento.

Alimentazione



PERICOLO

PERICOLO ELETTRICO. La continuità del circuito di messa a terra è vitale per il funzionamento in sicurezza dell'apparecchiatura. Non mettere mai in funzione l'apparecchiatura con il conduttore di messa a terra scollegato.



PERICOLO

PERICOLO ELETTRICO. Utilizzare cavi di alimentazione configurati in maniera corretta e approvati per la tensione fornita nella propria struttura.



PERICOLO

PERICOLO ELETTRICO. Collegare il sistema in una presa elettrica dotata di messa a terra con capacità di corrente adeguata.

Classificazione sovraccarico di tensione

Il sistema StepOne fa parte della categoria di installazione (sovraccarico di tensione) II ed è classificato come apparecchiatura portatile.

Sicurezza LED

Per garantire un funzionamento sicuro del LED:

- La manutenzione del sistema deve essere gestita da un Rappresentante tecnico Applied Biosystem.
- Tutti i pannelli di copertura dello strumento devono trovarsi in posizione durante il funzionamento. Quando tutti i pannelli sono installati, non sono presenti radiazioni rilevabili. In caso di rimozione di un pannello durante il funzionamento del LED (durante l'assistenza a interblocchi di sicurezza disabilitati), si potrebbe venire esposti ad emissioni LED che superano la Classe **3B**.
- Non rimuovere le etichette di sicurezza né disabilitare gli interblocchi di sicurezza.

Sicurezza rischio biologico

Rischi biologici generici



AVVERTENZA

RISCHIO BIOLOGICO. Campioni biologici quali tessuti, fluidi corporei, agenti infettivi e sangue umano e di altri animali rappresentano un veicolo potenziale di trasmissione di malattie infettive. Rispettare tutte le norme locali, regionali/provinciali e/o statali. Indossare gli opportuni corredi di protezione, tra cui protezioni oculari, maschere di protezione, indumenti/camici da laboratorio e guanti. Eseguire ogni lavoro in strutture ben equipaggiate, utilizzando la corretta apparecchiatura di sicurezza (ad esempio, dispositivi di contenimento fisico). Addestrare il personale in base alle normative applicabili e ai requisiti dell'azienda/ente prima di lavorare con materiali potenzialmente infettivi. Leggere e seguire le linee guida applicabili e/o i requisiti delle normative presenti in:

- Linee guida dello U.S. Department of Health and Human Services pubblicate in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (N. stock 017-040-00547-4; <http://bmbi.od.nih.gov>)
- Occupational Safety and Health Standards, Bloodborne Pathogens (29 CFR§1910.1030; http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_01/29cfr1910a_01.html).
- Protocolli del Programma di biosicurezza della propria azienda/ente per il lavoro a contatto con materiali potenzialmente infetti.

Ulteriori informazioni sulle linee guida per il rischio biologico sono disponibili all'indirizzo:

<http://www.cdc.gov>

Sicurezza della stazione di lavoro

Una configurazione ergonomicamente corretta della propria stazione di lavoro può ridurre o prevenire effetti quali l'affaticamento, il dolore e la tensione. Ridurre al minimo o eliminare tali effetti configurando la stazione di lavoro in maniera tale da favorire posizioni di lavoro neutre o rilassate.



PERICOLO MUSCOLOSCHELETRICO E DA MOVIMENTI RIPETITIVI. Questi pericoli sono causati da potenziali fattori di rischio che includono, in modo non esclusivo, il movimento ripetitivo, una posizione scorretta, sforzi accentuati, il mantenimento di posizioni statiche non salutari, la pressione da contatto e altri fattori ambientali correlati alla stazione di lavoro.

Per ridurre al minimo i rischi muscoloscheletrici e i movimenti ripetitivi:

- Utilizzare apparecchiature che sopportino in maniera comoda la posizione di lavoro neutra dell'utente e consentano un adeguato accesso a tastiera, monitor e mouse.
- Posizionare tastiera, mouse e monitor in una posizione tale da promuovere posture rilassate del busto e della testa.

Norme disicurezza e di Compatibilità Elettromagnetica (EMC)

Norme di sicurezza per U.S.A e Canada



Il sistema StepOne è stato testato ed è conforme a:

UL 61010A-1/CAN/CSA C22.2 No. 1010.1-92, "Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: General Requirements."

UL 61010A-2-010/CAN/CSA 1010.2.010, "Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials."

FDA "Radiation Control for Health and Safety Act of 1968 Performance Standard 21 CFR 1040.10 and 1040.11," se pertinente.

Norme EMC per il Canada

Lo strumento è stato testato ed è conforme alla norma ICES-001, Comma 3: "Industrial, Scientific, and Medical Radio Frequency Generators."

Norme di sicurezza e di EMC per l'Europa



Sicurezza

Questo strumento soddisfa i requisiti europei per la sicurezza (Direttiva sulla bassa tensione 73/23/CEE). Questo strumento è stato testato ed è conforme alla norma EN 61010-1:2001, "Safety Requirements for Electrical Equipment for Measurement, Control, and Laboratory Use, Part 1: General Requirements."

EN 61010-2-010, "Particular Requirements for Laboratory Equipment for the Heating of Materials."

EN 61010-2-081, "Particular Requirements for Automatic and Semi-Automatic Laboratory Equipment for Analysis and Other Purposes."

EN 60825-1, "Radiation Safety of Laser Products, Equipment Classification, Requirements, and User's Guide."

EMC

Questo strumento soddisfa i requisiti europei per le emissioni e le immunità (Direttiva EMC 89/336/CEE). Questo strumento è stato testato ed è conforme alla norma EN 61326 (Gruppo 1, Classe B), "Electrical Equipment for Measurement, Control and Laboratory Use – EMC Requirements."

Norme EMC per l'Australia



Questo strumento è stato testato ed è conforme alla norma AS/NZS 2064, "Limits and Methods Measurement of Electromagnetic Disturbance Characteristics of Industrial, Scientific, and Medical (ISM) Radio-frequency Equipment."

Questo capitolo comprende i paragrafi:

- Informazioni sul sistema StepOne™ 2
- Informazioni sugli esperimenti con curva standard 4
- Come utilizzare questa guida 7
- Informazioni sull'esperimento di esempio 8
- Flusso di lavoro dell'esperimento di esempio 9

Nota: Per ulteriori informazioni sugli argomenti trattati in questa guida, accedere alla voce Help (Guida) nel software del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System premendo **F1**, facendo clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionando **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

Informazioni sul sistema StepOne™

Il sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (sistema StepOne™) utilizza reagenti fluorescenti della reazione a catena della polimerasi (PCR) per fornire:

- Rilevamento quantitativo delle sequenze target dell'acido nucleico (target) utilizzando analisi in tempo reale.
- Rilevamento qualitativo delle sequenze target dell'acido nucleico (target) utilizzando analisi end-point e con curva di melting.

Informazioni sull'acquisizione dei dati

Il sistema StepOne acquisisce dati di fluorescenza non elaborati in punti diversi durante una PCR, in dipendenza del tipo di esecuzione:

Tipo di esecuzione		Punto di acquisizione dati
Sessioni di analisi in tempo reale	Curva standard	Lo strumento acquisisce dati dopo ogni fase di estensione della PCR.
	Curva standard relativa	
	C _T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)	
Sessioni di analisi end-point	Genotipizzazione	Lo strumento acquisisce dati prima e dopo la PCR. Per gli esperimenti di genotipizzazione, il software StepOne™ è abilitato anche ad acquisire dati durante la sessione di analisi (in tempo reale), come aiuto nella risoluzione di eventuali problemi.
	Presenza/Assenza	Lo strumento acquisisce dati prima e dopo la PCR.

Indipendentemente dal tipo di esecuzione, un punto di acquisizione dati o di *lettura* consiste in tre fasi:

- 1. Eccitazione** – Lo strumento StepOne™ illumina tutti i pozzetti della piastra di reazione all'interno dello strumento StepOne, eccitando i fluorofori in ogni reazione.
- 2. Emissione** – L'ottica dello strumento StepOne focalizza la fluorescenza residua emessa dai pozzetti della piastra di reazione. L'immagine risultante acquisita dal dispositivo consiste unicamente nella luce che corrisponde al range ridotto delle lunghezze d'onda.
- 3. Acquisizione** – Lo strumento StepOne assembla una rappresentazione digitale della fluorescenza residua acquisita durante un intervallo dalla durata fissa. Il software StepOne memorizza l'immagine fluorescente non elaborata per l'analisi. Se necessario, il software esegue letture aggiuntive come richiesto dai reagenti fluorescenti utilizzati nell'esperimento.

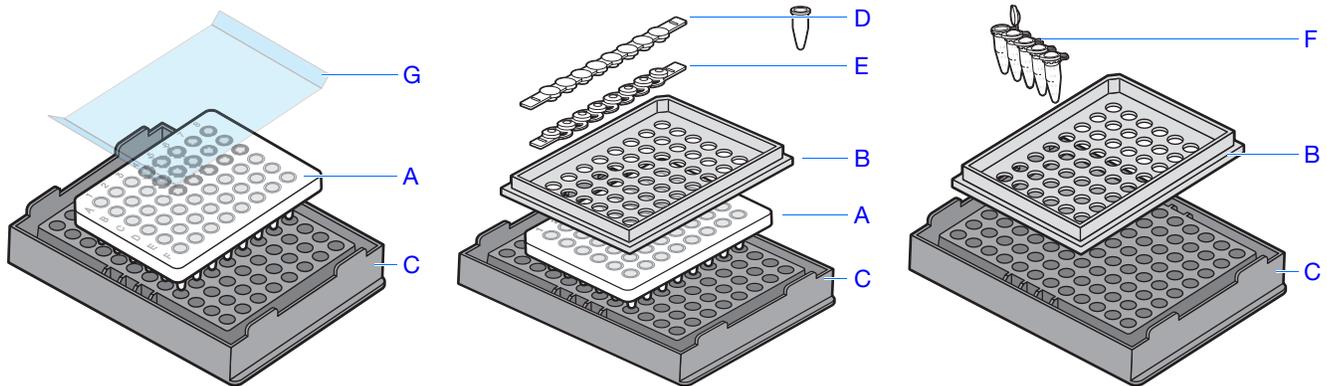
Dopo una sessione di analisi, il software StepOne utilizza i dati di calibrazione (spaziale, del colorante e di background) per determinare la posizione e l'intensità dei segnali fluorescenti in ogni lettura, il colorante associato a ogni segnale fluorescente e il significato del segnale.

Note

Materiali di consumo supportati

Il sistema StepOne supporta i materiali di consumo elencati qui di seguito. È possibile utilizzare tali materiali di consumo sia con i reagenti/protocolli standard sia con quelli veloci.

Materiali di consumo	Numero di catalogo
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates • MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film 	<ul style="list-style-type: none"> • 4375816 • 4375323
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips • MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358293 • 4323032
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps 	<ul style="list-style-type: none"> • 4358297
<ul style="list-style-type: none"> • MicroAmp™ Fast 48-Well Trays • MicroAmp™ 48-Well Base Adaptor • MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base 	<ul style="list-style-type: none"> • 4375282 • 4375284 • 4312063



#	Materiali di consumo
A	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
B	MicroAmp™ Fast 48-Well Tray
C	MicroAmp™ Splash Free 96-Well Base
D	MicroAmp™ Optical 8-Cap Strip
E	MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip
F	MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps
G	MicroAmp Optical 48-Well Adhesive Film

Note

Per ulteriori informazioni

Per informazioni su:

- Sistema StepOne, fare riferimento alla guida software (Help) del sistema *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Nota: Per accedere alla voce Help (Guida), selezionare **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)** all'interno del software StepOne.

- Esperimenti con curva standard relativa e/o C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$), fare riferimento alla *Guida del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System per gli esperimenti con curva standard e C_T comparativo*.
- Esperimenti di genotipizzazione, fare riferimento alla guida *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System per gli esperimenti di genotipizzazione*.
- Esperimenti di presenza/assenza, fare riferimento alla *Guida del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Getting Started Guide for Presence/Absence Experiments*.

Informazioni sugli esperimenti con curva standard

Esperimenti PCR in tempo reale

Gli esperimenti con curva standard sono esperimenti PCR in tempo reale. Negli esperimenti PCR in tempo reale:

- Lo strumento monitora lo sviluppo della PCR per come si verifica (Kwok and Higuchi, 1989).
- I dati vengono acquisiti durante lo sviluppo della PCR.
- Le reazioni sono caratterizzate dal punto temporale durante la fase ciclica quando l'amplificazione di un target viene rilevata la prima volta (Saiki *et al.*, 1985).

Nota: In questa guida, il termine *esperimento* si riferisce all'intero sviluppo dell'esperimento, dal disegno all'analisi dei dati.

Informazioni sugli esperimenti con curva standard

Gli esperimenti con curva standard determinano la quantità assoluta di un target in un campione. Per l'ottenimento dei risultati viene utilizzata una curva standard costruita da una serie di diluizioni di una quantità conosciuta.

Componenti

I seguenti componenti sono necessari nell'impostazione delle reazioni PCR per esperimenti con curva standard:

- **Campione** – Il campione nel quale la quantità del target è non nota.
- **Standard** – Un campione dalla quantità nota.
- **Serie di diluizioni standard** – Un set di diluizioni dello standard (ad esempio, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) utilizzate per la costruzione di una curva standard.
- **Replicati** – Reazioni identiche contenenti componenti e volumi identici.
- **Controlli negativi** – Campioni contenenti acqua oppure buffer invece che templato. I controlli negativi non devono amplificarsi.

Note

Opzioni PCR Nell'esecuzione di una PCR in tempo reale, scegliere tra:

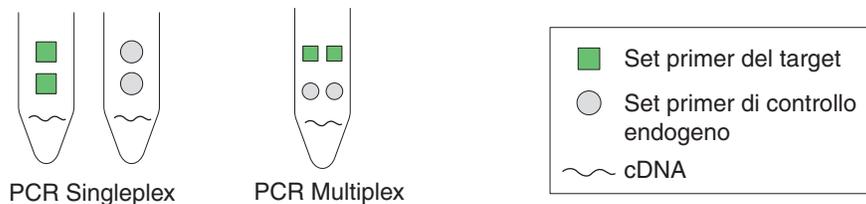
- PCR singleplex e multiplex (di seguito)
e
- RT-PCR in 1 fase e in 2 fasi ([pagina 5](#))

PCR singleplex rispetto a PCR multiplex

È possibile inoltre eseguire una reazione PCR come:

- Reazione singleplex, dove un'unica sonda/primer è presente nella provetta o nel pozzetto di reazione. È possibile amplificare un solo target o controllo endogeno per reazione.
oppure
- Reazione multiplex, dove due o più sonde/primer sono presenti nella provetta o nel pozzetto di reazione. Ogni set amplifica un target specifico o un controllo endogeno.

IMPORTANTE! Non è possibile utilizzare i reagenti SYBR® Green per reazioni multiplex.



RT-PCR in 1 fase rispetto alla RT-PCR in 2 fasi

È possibile eseguire la trascrizione inversa (RT) e la PCR in una singola reazione (1 fase) oppure in reazioni separate (2 fasi). La configurazione del reagente utilizzato dipende dall'eventualità che si esegua una RT-PCR in 1 fase oppure in 2 fasi:

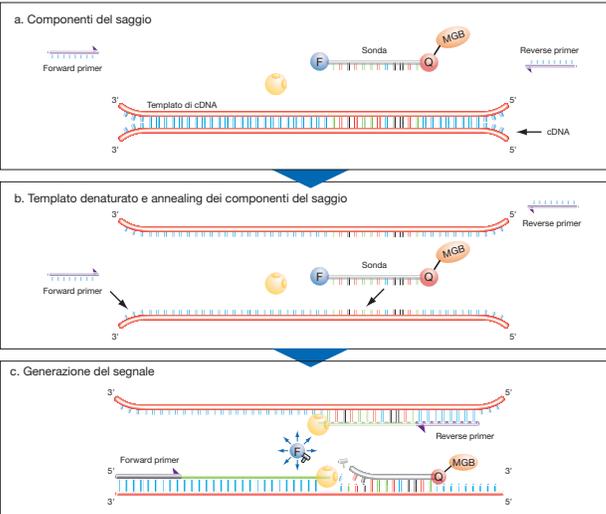
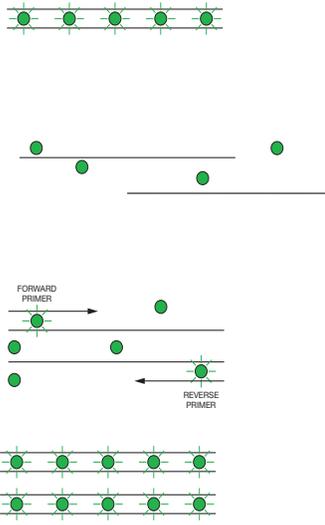
- Nella RT-PCR in 1 fase, l'RT e la PCR avvengono in un sistema a un solo buffer, il che determina la convenienza nell'utilizzare una sola provetta per l'amplificazione dell'RT e della PCR. Comunque, non è possibile utilizzare una Master Mix per PCR veloce oppure l'enzima per la prevenzione del carryover, AmpErase® UNG (uracil-N-glycosylase), per eseguire la RT-PCR in 1 fase.
- L'RT-PCR in 2 fasi viene eseguita in due reazioni separate: Prima, viene eseguita la trascrizione inversa dell'RNA in cDNA, quindi il cDNA viene amplificato dalla PCR. Questo metodo è utile per il rilevamento di trascrizioni multiple da un singolo template cDNA oppure per l'immagazzinamento di aliquote di cDNA per un utilizzo successivo. È possibile utilizzare l'enzima AmpErase® UNG per prevenire la contaminazione da carryover.

Note

Nota: Per ulteriori informazioni sull'enzima AmpErase[®] UNG, fare riferimento alla Guida reagenti del sistema Applied Biosystems StepOne[™] Real-Time PCR System.

Reagenti Reagenti TaqMan[®] e SYBR[®] Green

Applied Biosystems offre i reagenti TaqMan[®] and SYBR[®] Green per l'utilizzo con il sistema StepOne. Entrambi i tipi di reagenti sono brevemente descritti nella tabella qui di seguito.

Tipo di reagente	Processo
<p>Reagenti o kit TaqMan[®]</p> <p>Descrizione</p> <p>I reagenti TaqMan utilizzano una sonda fluorogenica per l'abilitazione al rilevamento di uno specifico prodotto della PCR accumulatosi durante i cicli PCR.</p> <p>Vantaggi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumenta la specificità con una sonda. L'ibridazione specifica tra la sonda e il target genera il segnale di fluorescenza. • Fornisce la capacità multiplex. • Sono disponibili saggi ottimizzati. • Consente l'ottenimento del saggio 5'-nuclease durante la PCR. • È possibile utilizzarlo sia nella RT-PCR in 1 fase sia nella RT-PCR in 2 fasi. 	<p>PCR e rilevamento di cDNA</p>  <p>LEGENDA</p> <ul style="list-style-type: none"> RP Random Primer F Colorante FAM[™] Q Quencher MGB Minor Groove Binder AmpliQ Gold[®] DNA Polymerase Sonda Primer Templato Primer esteso
<p>Reagenti SYBR[®] Green</p> <p>Descrizione</p> <p>I reagenti SYBR Green utilizzano il colorante SYBR[®] Green I, un colorante legante il DNA a doppia elica, per il rilevamento dei prodotti della PCR accumulatisi durante i cicli PCR.</p> <p>Vantaggi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Economico (non è necessaria alcuna sonda). • Consente la misurazione della T_m di tutti i prodotti della PCR per l'analisi della curva di melting. • È possibile utilizzarlo sia nella RT-PCR in 1 fase sia nella RT-PCR in 2 fasi. <p>Limitazioni</p> <p>Si fissa non specificamente alle sequenze di DNA a doppia elica. Per prevenire falsi segnali positivi, verificare la formazione di un prodotto non specifico utilizzando la curva di melting oppure l'analisi del gel.</p>	 <p>Fase 1: Impostazione reazione Il colorante SYBR[®] Green 1 dà luogo a fluorescenza quando si lega al DNA a doppia elica.</p> <p>Fase 2: Denaturazione Quando il DNA viene denaturato, il colorante SYBR[®] Green 1 viene rilasciato e la fluorescenza drasticamente ridotta.</p> <p>Fase 3: Polimerizzazione Durante l'estensione, i primer attuano l'anneal e viene generato il prodotto della PCR.</p> <p>Fase 4: Polimerizzazione completata Il colorante SYBR[®] Green 1 si lega al prodotto a doppia elica, con un netto aumento della fluorescenza rilevata dallo strumento.</p>

Note

IMPORTANTE! Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRA™ come reporter o quencher con il sistema StepOne™.

Altri reagenti

È possibile utilizzare altri reagenti fluorescenti sul sistema StepOne, ma:

- Il software StepOne calcola automaticamente i volumi di reazione per i reagenti TaqMan e SYBR Green, ma non fa altrettanto per gli altri reagenti.
- È necessario disegnare il proprio esperimento utilizzando il flusso di lavoro dell'impostazione avanzata invece del Design Wizard. (Vedere la sezione [“Flusso di lavoro impostazione avanzata” a pagina 110](#)).

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sugli esperimenti PCR in tempo reale, sulle opzioni PCR e sui reagenti, fare riferimento alla *Guida reagenti del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Come utilizzare questa guida

Questa guida funge sia da tutorial sia da guida nell'esecuzione degli esperimenti.

Utilizzo della guida come tutorial

Utilizzando i dati dell'esperimento di esempio forniti con il software StepOne, è possibile usare questa guida come tutorial per l'esecuzione di un esperimento con curva standard sul sistema StepOne. Seguire le procedure contenute nei capitoli da 2 a 5:

Capitolo	Procedura
2	Disegno dell'esperimento utilizzando il Design Wizard nel software StepOne.
3	Preparazione dell'esperimento, utilizzando i reagenti e i volumi calcolati dal Design Wizard nel capitolo 2.
4	Esecuzione dell'esperimento su uno strumento StepOne (configurazione indipendente o co-locata)
5	Analisi dei risultati.

Per ulteriori informazioni, vedere [“Informazioni sull'esperimento di esempio” a pagina 8](#).

Utilizzo della guida per i propri esperimenti

Dopo il completamento degli esercizi introduttivi nei capitoli da 2 a 5, è possibile utilizzare questo manuale come guida al flusso di lavoro del Design Wizard per i propri esperimenti con curva standard. Ogni procedura nei capitoli da 2 a 5 contiene un set di linee guida che fornisce informazioni sulle modalità di esecuzione dell'azione per i propri esperimenti.

Note

È anche possibile utilizzare uno degli altri flussi di lavoro forniti nel software StepOne per l'esecuzione degli esperimenti. La tabella qui di seguito fornisce un riepilogo di tutti i flussi di lavoro disponibili nel software StepOne.

Flusso di lavoro	Descrizione	Vedere...
Design Wizard	Immissione dei parametri dell'esperimento secondo le indicazioni del wizard.	Capitolo 2
Impostazione avanzata	Impostazione di un nuovo esperimento sulla base del disegno del proprio esperimento. Consente flessibilità nel disegno per utenti esperti.	pagina 110
Avvio rapido	Esecuzione di un nuovo esperimento senza informazioni di impostazione della piastra.	pagina 111
Templato	Impostazione di un nuovo esperimento utilizzando le informazioni di impostazione provenienti da un templat.	pagina 112
Esportazione/Importazione	Importazione dei disegni di esperimento dai file di testo ASCII contenenti le informazioni di impostazione dell'esperimento.	pagina 113

Informazioni sull'esperimento di esempio

Per illustrare come eseguire gli esperimenti con curva standard, questa guida conduce l'utente attraverso i processi di disegno, preparazione, esecuzione e analisi di un esperimento di esempio. L'esperimento di esempio rappresenta una tipica impostazione che è possibile utilizzare per familiarizzare rapidamente con il sistema StepOne.

Descrizione L'obiettivo dell'esperimento di esempio con curva standard è quello di determinare la quantità del gene RNase P in due popolazioni.

Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- I campioni consistono in DNA genomico isolato da due popolazioni.
- Il target è il gene RNase P.
- Una sola curva standard viene impostata per il gene RNase P (target). Lo standard utilizzato per le serie di diluizioni standard contiene quantità note del gene RNase P. È necessaria un'unica curva standard poiché è allo studio un singolo target.

Nota: Negli esperimenti nei quali sono allo studio target multipli, è necessaria una curva standard per ogni target.

- Vengono eseguiti tre replicati di ogni campione e di ogni punto di diluizione nella curva standard per garantire significatività statistica.
- L'esperimento viene disegnato per una PCR singleplex, dove ogni pozzetto contiene un set di sonde/primer per un singolo target.
- Le reazioni vengono impostate per una RT-PCR in due fasi.

Note

- I set di sonde/primer provengono dal saggio RNase P Applied Biosystems.

Nota: Non è disponibile il saggio Human RNase P-MGB-Probe TaqMan® Gene Expression. È possibile tuttavia ordinarlo come saggio Custom TaqMan® Gene Expression (n. di cat. 4331348). Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRA™ come reporter o quencher con il sistema StepOne™.

Layout piastra di reazione

Il layout della piastra di reazione per l'esperimento di esempio con curva standard è indicato qui di seguito.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	RNase P	RNase P	RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop1 RNase P	pop2 RNase P	pop2 RNase P
B	pop2 RNase P	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 1E4	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 5E3	RNase P 2.5E3
C	RNase P 2.5E3	RNase P 2.5E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 1.25E3	RNase P 625	RNase P 625	RNase P 625
D								
E								
F								

Informazioni sui dati dell'esperimento di esempio

Il file dei dati per l'esperimento di esempio si installa con il software StepOne. È possibile trovare il file per l'esperimento di esempio sul proprio computer:

<unità>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

dove <unità> indica il disco rigido del computer sul quale è installato il software StepOne. L'unità di installazione predefinita per il software è l'unità C.

Flusso di lavoro dell'esperimento di esempio

La figura a [pagina 10](#) indica il flusso di lavoro per l'esperimento di esempio con curva standard.

Note

Avvio dell'esperimento

Disegno dell'esperimento (Capitolo 2)

1. Creazione di un nuovo esperimento.
2. Definizione delle proprietà dell'esperimento.
3. Definizione dei metodi e dei materiali.
4. Impostazione dei target.
5. Impostazione degli standard.
6. Impostazione dei campioni.
7. Impostazione del metodo di esecuzione.
8. rivisualizzazione dell'impostazione della reazione.
9. Ordinazione dei materiali per l'esperimento.
10. Fine del flusso di lavoro del Design Wizard.

Preparazione delle reazioni (Capitolo 3)

1. Preparare le diluizioni del campione.
2. Preparazione delle serie di diluizioni standard.
3. Preparazione della miscela di reazione per ogni saggio target.
4. Preparazione della piastra di reazione.

Esecuzione dell'esperimento (Capitolo 4)

1. Preparazione per l'esecuzione.
2. Abilitazione delle impostazioni di notifica.
3. Avvio dell'esecuzione.
4. Monitoraggio dell'esecuzione.
5. Download dello strumento e trasferimento dei dati.

Analisi dell'esperimento (Capitolo 5)

Sezione 1, rivisualizzazione dei risultati:

1. Analisi.
2. Visualizzazione schermata Standard Curve (Curva standard).
3. Visualizzazione schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione).
4. Visualizzazione tabella Well (Pozzetto).
5. Pubblicazione dei dati.

Sezione 2, risoluzione problemi (se necessario):

1. Visualizzazione impostazioni di analisi; regolazione linea di base/soglia.
2. Visualizzazione schermata QC Summary (Riepilogo CQ).
3. Omissione pozzetti.

Fine dell'esperimento

Note

2

Disegno dell'esperimento

Questo capitolo comprende i paragrafi:

■ Descrizione generale	12
■ Creazione di un nuovo esperimento	13
■ Definizione delle proprietà dell'esperimento	16
■ Definizione dei metodi e dei materiali	18
■ Impostazione dei target	20
■ Impostazione degli standard	22
■ Impostazione dei campioni	25
■ Impostazione del metodo di esecuzione	27
■ Verifica dell'impostazione della reazione	29
■ Ordinazione dei materiali per l'esperimento	35
■ Termine del flusso di lavoro del Design Wizard	38

Nota: Per ulteriori informazioni sugli argomenti trattati in questa guida, accedere alla voce Help (Guida) nel software del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System premendo **F1**, facendo clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionando **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

Note

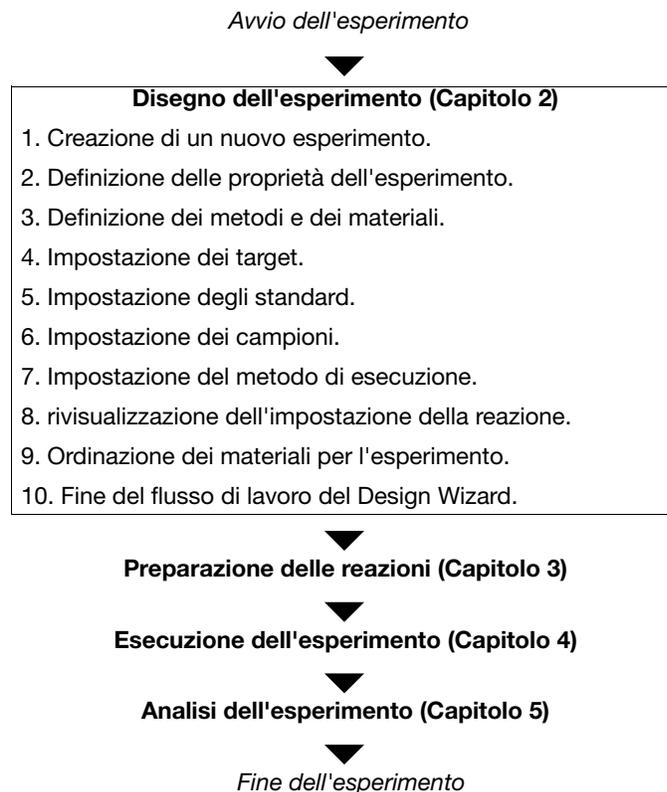
Descrizione generale

Questo capitolo spiega come utilizzare il Design Wizard nel software StepOne™ per l'impostazione dell'esperimento di esempio con curva standard. Il Design Wizard guida l'utente nell'applicazione delle migliori scelte raccomandate da Applied Biosystems in relazione all'immissione dei parametri di disegno per l'esperimento di esempio.

Flusso di lavoro dell'esperimento di esempio

Il flusso di lavoro per il disegno dell'esperimento di esempio fornito con questa guida introduttiva è indicato qui di seguito.

Nota: Disegnare l'esperimento di esempio utilizzando il flusso di lavoro del Design Wizard nel software StepOne. È possibile selezionare flussi di lavoro alternativi per il disegno dei propri esperimenti (vedere [“Utilizzo della guida per i propri esperimenti”](#) a pagina 7).



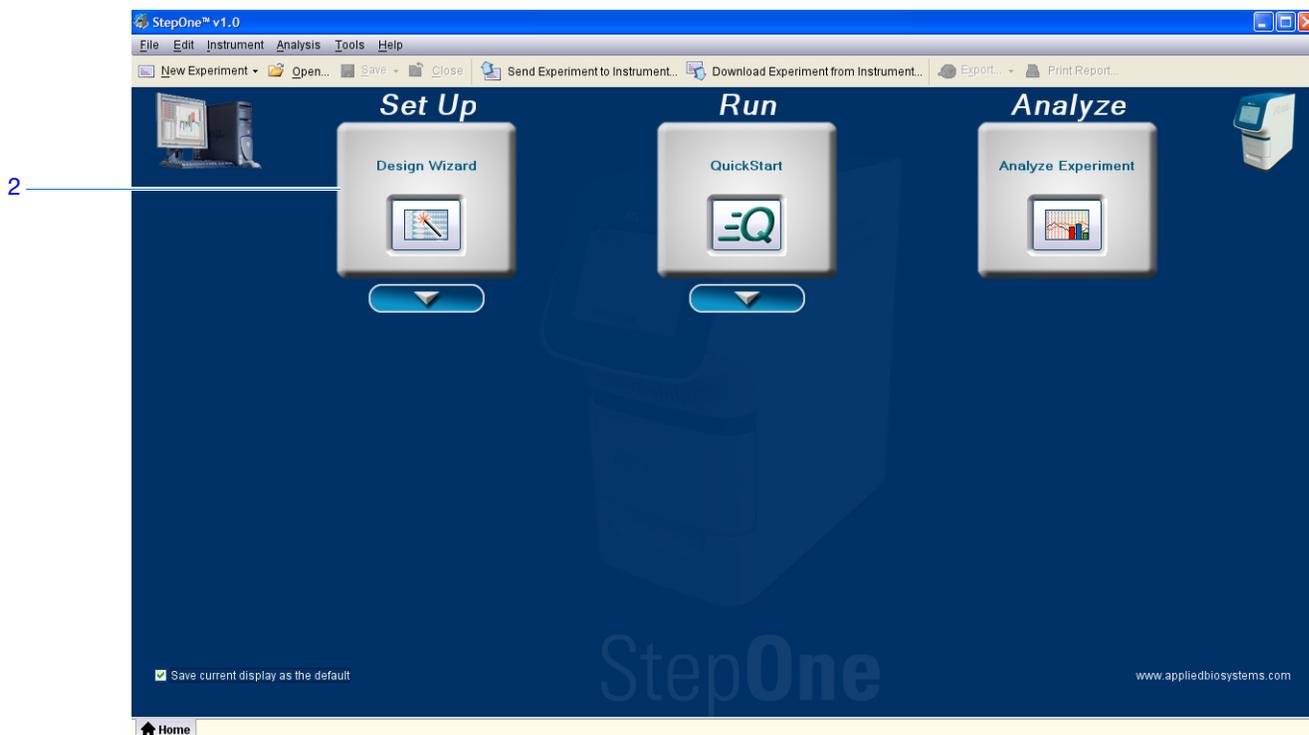
Note

Creazione di un nuovo esperimento

Creare un nuovo esperimento utilizzando il Design Wizard nel software StepOne.

Creazione di un esperimento

1. Fare doppio clic su  (collegamento software StepOne) oppure selezionare **Start (Avvio) ▶ All Programs (Tutti i programmi) ▶ Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0**.
2. Nella schermata Home, fare clic su  **Design Wizard** per aprire il Design Wizard.



3. Vedere “Elementi del software” qui di seguito per informazioni sulla navigazione all'interno del Design Wizard.

Elementi del software

Gli elementi del software StepOne per il Design Wizard sono illustrati qui di seguito.

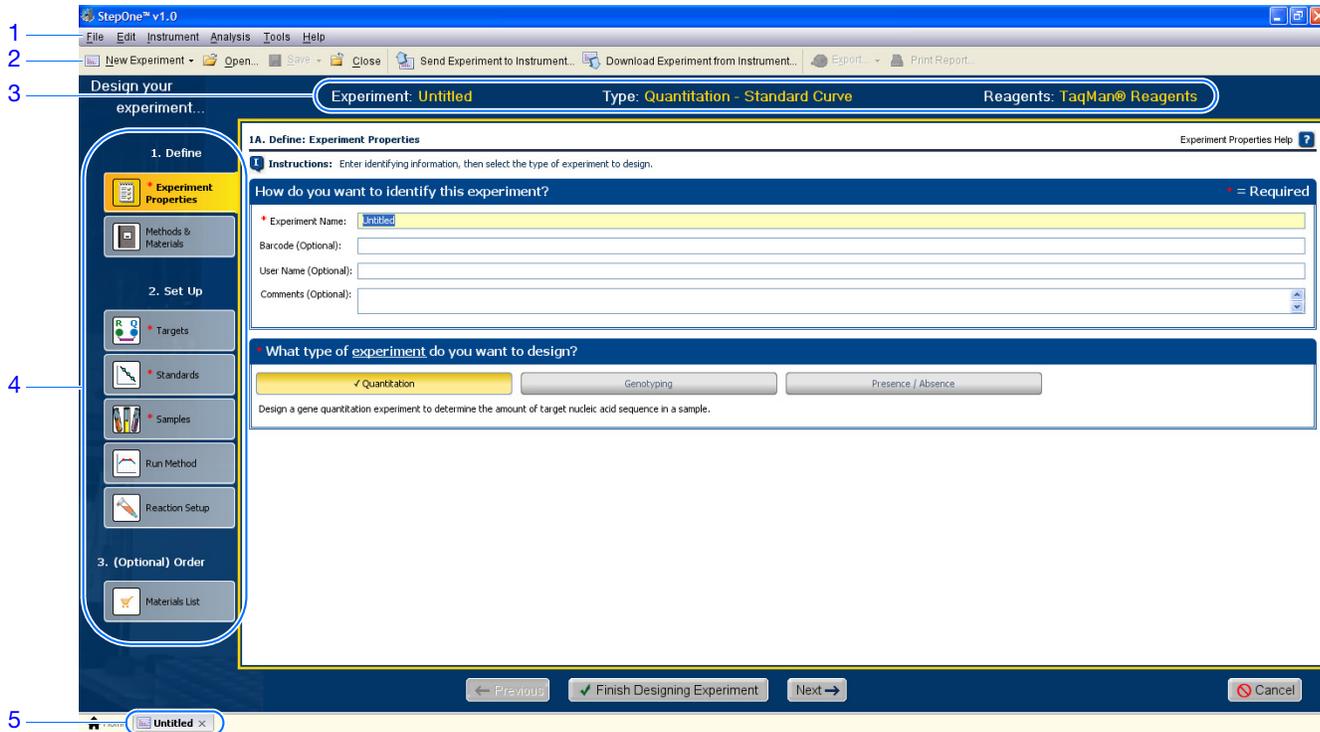
1. Barra dei menu – Visualizza i menu disponibili nel software:
 - File
 - Edit (Modifica)
 - Instrument (Strumento)
 - Analysis (Analisi)
 - Tools (Strumenti)
 - Help (Guida)

Note

2. Barra degli strumenti – Visualizza gli strumenti disponibili nel software:
 - New Experiment (Nuovo esperimento)
 - Open (Apri)
 - Close (Chiudi)
 - Send Experiment to Instrument (Invia esperimento allo strumento)
 - Download Experiment from Instrument (Scarica esperimento dallo strumento)
3. Intestazione esperimento – Visualizza il nome dell'esperimento, il tipo di esperimento e i reagenti per l'apertura dell'esperimento.
4. Pannello di navigazione – Fornisce collegamenti (link) con tutte le schermate del Design Wizard:
 - Experiment Properties (Proprietà dell'esperimento)
 - Methods & Materials (Metodi e materiali)
 - Targets (Target)
 - Standards (Standard)
 - Samples (Campioni)
 - Run Method (Metodo di esecuzione)
 - Reaction Setup (Impostazione reazione)
 - Materials List (Elenco materiali)

Nota: Il Design Wizard visualizza inizialmente la quantificazione, tipo di esperimento con curva standard. È possibile che le schermate del Design Wizard disponibili cambino nel caso venga selezionato un tipo di esperimento diverso. Ad esempio, la schermata Relative Quantitation Settings (Impostazioni quantificazione relativa) non viene visualizzata fino all'avvenuta selezione del tipo di esperimento con curva standard relativa o con C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo.

5. Schede esperimento – Visualizzano una scheda per ogni esperimento aperto.



Note

Definizione delle proprietà dell'esperimento

Nella schermata Experiment Properties (Proprietà dell'esperimento), immettere le informazioni di identificazione dell'esperimento, quindi selezionare il tipo di esperimento da disegnare.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- L'esperimento viene identificato come un esempio.
- Viene utilizzata una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- L'esperimento è di quantificazione.

Completamento della schermata Experiment Properties (Proprietà esperimento)

1. Fare clic sul campo **Experiment Name (Nome esperimento)**, quindi immettere **Standard Curve Example (Esempio curva standard)**.

Nota: L'intestazione dell'esperimento si aggiorna con il nome dell'esperimento immesso.

2. Fare clic sul campo **Barcode (Codice a barre)**, quindi immettere il codice a barre sulla piastra di reazione PCR.
3. Fare clic sul campo **User Name (Nome utente)**, quindi immettere **Example User (Utente esempio)**.
4. Fare clic sul campo **Comments (Commenti)**, quindi immettere **Standard Curve Getting Started Guide Example (Esempio guida introduttiva curva standard)**.
5. Selezionare **Quantitation (Quantificazione)** per il tipo di esperimento.
6. Fare clic su **Next > (Avanti)**.

1A. Define: Experiment Properties Experiment Properties Help ?

Instructions: Enter identifying information, then select the type of experiment to design.

How do you want to identify this experiment? = Required

Experiment Name:

Barcode (Optional):

User Name (Optional):

Comments (Optional):

What type of experiment do you want to design?

Quantitation Genotyping Presence / Absence

Design a gene quantitation experiment to determine the amount of target nucleic acid sequence in a sample.

Note

Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Immettere un nome dell'esperimento che sia descrittivo e facile da ricordare. Il nome dell'esperimento viene utilizzato come nome predefinito del file dell'esperimento. È possibile inserire fino a 100 caratteri nel campo Experiment Name (Nome esperimento).

Nota: Non è possibile utilizzare i seguenti caratteri nel campo Experiment Name (Nome esperimento): slash (/), backslash (\), maggiore di (>), minore di (<), asterisco (*), punto interrogativo (?), virgolette ("), linea verticale (|), due punti (:), o punto e virgola (;).

- Utilizzare MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plates, MicroAmp™ Fast 8-Tube Strips oppure MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Caps. È possibile utilizzare i materiali di consumo rapido sia con i reagenti veloci sia con quelli standard.
- *(Opzionale)* Immettere un codice a barre per l'identificazione del codice a barre sulla piastra di reazione PCR. È possibile inserire fino a 100 caratteri nel campo Barcode (Codice a barre).
- *(Opzionale)* Immettere un nome utente per l'identificazione del titolare dell'esperimento. È possibile inserire fino a 100 caratteri nel campo User Name (Nome utente).
- *(Opzionale)* Immettere commenti per descrivere l'esperimento. È possibile inserire fino a 1000 caratteri nel campo Comments (Commenti).
- Selezionare **Quantitation (Quantificazione)** come tipo di esperimento.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni su:

- Completamento della schermata Experiment Properties (Proprietà esperimento), accedere alla Guida (Help) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.
- Materiali di consumo, vedere ["Materiali di consumo supportati" a pagina 3](#).
- Esperimenti di quantificazione, fare riferimento alla *Guida reagenti del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Note

Definizione dei metodi e dei materiali

Nella schermata Methods & Materials (Metodi e Materiali), selezionare il metodo di quantificazione, i reagenti, la velocità di rampa e il template PCR da utilizzare per l'esperimento.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- Viene utilizzato il metodo di quantificazione con curva standard.
- Vengono utilizzati reagenti TaqMan®.
- Nella sessione analitica dello strumento viene utilizzata la velocità di rampa standard.
- Il tipo di template è gDNA purificato (isolato da due popolazioni). Prima dell'utilizzo del template gDNA, è necessario estrarre il gDNA dal tessuto o dal campione.

Completamento della schermata Methods & Materials (Metodi e materiali)

1. Selezionare **Standard Curve (Curva standard)** come metodo di quantificazione.
2. Selezionare **TaqMan® Reagents (Reagenti TaqMan®)** per i reagenti.
3. Selezionare **Standard (~2 ore per il completamento di un'esecuzione)** per la velocità di rampa.
4. Selezionare **gDNA (DNA genomico)** per il tipo di template.
5. Fare clic su **Next > (Avanti)**.

1B. Define: Methods & Materials Methods & Materials Help ?

Instructions: Select the quantitation method, reagents, ramp speed, and type of template for the real-time PCR reactions.

Which quantitation method are you using?

Standard Curve Relative Standard Curve Comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$)

With the standard curve method, you use standards to determine the absolute quantity of target sequence in a sample.

Which reagents do you want to use to detect the target sequence?

TaqMan® Reagents SYBR® Green Reagents

These real-time PCR reactions contain two primers and a TaqMan® probe. The primers are designed to amplify the target sequence. The TaqMan probe is designed to hybridize to the target sequence and generate fluorescence signal when the target sequence is amplified.

Which ramp speed do you want to include in the instrument run?

Standard (~ 2 hours to complete a run) Fast (~ 40 minutes to complete a run)

For optimal results using the standard ramp speed, Applied Biosystems recommends standard reagents for your real-time PCR reactions.

What type of template do you want to use in the real-time PCR reactions?

cDNA (complementary DNA) RNA gDNA (genomic DNA)

You are adding purified gDNA to the real-time PCR reactions. You have already extracted the gDNA from tissue or sample.

Note

Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Selezionare **Standard Curve (Curva standard)** come metodo di quantificazione. Gli esperimenti con curva standard determinano la quantità assoluta di un target in un campione. Per l'ottenimento dei risultati viene utilizzata una curva standard costruita da una serie di diluizioni di una quantità conosciuta. Nell'impostazione della piastra di reazione, il metodo con curva standard richiede i target, gli standard e i campioni.
- Selezionare i reagenti da utilizzare:
 - Selezionare **TaqMan® Reagents (Reagenti TaqMan®)** nel caso si vogliono utilizzare reagenti TaqMan per rilevare l'amplificazione e quantificare la quantità di target nei campioni. I reagenti TaqMan consistono in due primer e in una sonda TaqMan®. I primer sono disegnati per l'amplificazione del target. La sonda TaqMan è disegnata per l'ibridazione del target e per la generazione del segnale di fluorescenza quando il target viene amplificato.

IMPORTANTE! Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRA™ come reporter o quencher con il sistema StepOne™.

- Selezionare **SYBR® Green Reagents** nel caso si vogliono utilizzare reagenti SYBR Green per rilevare l'amplificazione e quantificare la quantità di target nei campioni. I reagenti SYBR Green consistono in due primer e nel colorante SYBR Green. I primer sono disegnati per l'amplificazione del target. Il colorante SYBR Green genera un segnale di fluorescenza quando si fissa al DNA a doppia elica. Il colorante SYBR Green è spesso parte della SYBR Green Master mix aggiunta alla reazione. Nel caso si utilizzi il colorante SYBR Green:
 Selezionare la casella di controllo **Include Melt Curve (Includi curva di melting)** per eseguire l'analisi della curva di melting del target amplificato.
 Selezionare **Standard** come velocità di rampa. Non è disponibile alcuna Master mix veloce Applied Biosystems per reagenti SYBR Green.

Nota: È possibile utilizzare altri reagenti fluorescenti sul sistema StepOne, ma in questo caso è necessario disegnare il proprio esperimento utilizzando il flusso di lavoro Advanced Setup (Impostazione avanzata) invece del Design Wizard. Vedere la sezione [“Flusso di lavoro impostazione avanzata”](#) a pagina 110.

- Selezionare la velocità di rampa appropriata per la sessione analitica dello strumento:
 - Selezionare **Fast (Veloce) (~40 minuti per il completamento della sessione)** nel caso si utilizzino reagenti veloci per le reazioni PCR.
 - Selezionare **Standard (~2 ore per il completamento della sessione)** nel caso si utilizzino reagenti standard per le reazioni PCR (inclusi i reagenti SYBR Green e i reagenti TaqMan standard).
- Selezionare il template PCR appropriato:
 - Selezionare **cdNA (DNA complementare)** nel caso sia in esecuzione una RT-PCR in 2 fasi e sia già stata eseguita la trascrizione inversa per convertire l'RNA in cdNA. È in atto l'aggiunta del DNA complementare alle reazioni PCR.

Note

- Selezionare **RNA** nel caso sia in esecuzione una RT-PCR in 1 fase. È in atto l'aggiunta dell'RNA totale oppure dell'mRNA alle reazioni PCR.
- Selezionare **gDNA (DNA genomico)** nel caso sia già stato estratto il gDNA dal tessuto o dal campione. È in atto l'aggiunta del DNA genomico purificato alle reazioni PCR.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni su:

- Completamento della schermata Methods & Materials (Metodi e materiali), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.
- Utilizzo di altri metodi di quantificazione, fare riferimento alla *Guida introduttiva del sistema StepOne™ Real-Time PCR System per esperimenti con curva standard relativa e C_T comparativo*.
- Reagenti TaqMan e SYBR Green, fare riferimento alla *Guida reagenti del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
- PCR, inclusi PCR singleplex rispetto al PCR multiplex e RT PCR in 1 fase rispetto a quello in 2 fasi, fare riferimento alla *Guida reagenti del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

Impostazione dei target

Nella schermata Targets (Target), immettere il numero di target che si desidera quantificare nella piastra di reazione PCR, quindi impostare il saggio per ogni target.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- Viene quantificato un solo target nella piastra di reazione.
- Viene selezionata la casella di controllo Set Up Standards (Imposta standard). Quando viene selezionata questa casella di controllo, il software visualizza automaticamente la schermata Standards (Standard) dopo il completamento della schermata Targets (Target). Nella schermata Standards (Standard), è possibile impostare una curva standard per il saggio del target (vedere [“Impostazione degli standard” a pagina 22](#)).
- Viene impostato il saggio Target 1 per il target oggetto di studio. Per l'esperimento di esempio, si tratta del gene RNase P.

Completamento della schermata Targets (Target)

1. Fare clic sul campo **How many targets do you want to quantify in the reaction plate? (Quanti target si desidera quantificare nella piastra di reazione?)**, quindi immettere 1.

Nota: Il numero di righe nella tabella dei saggi target si aggiorna con il numero immesso.

Note

2. Selezionare la casella di controllo **Set Up Standards (Imposta standard)** per impostare gli standard per il saggio target.

Nota: La casella di controllo Set Up Standards (Imposta standard) viene selezionata in modo predefinito.

3. Impostare il saggio Target 1:
 - a. Fare clic sulla cella **Enter Target Name (Immetti nome target)** , quindi immettere **RNase P**.
 - b. nel menu a discesa Reporter, selezionare **FAM** (predefinito).
 - c. nel menu a discesa Quencher, selezionare **NFQ-MGB** (predefinito).
 - d. Conservare l'impostazione predefinita nel campo Color (Colore).
4. Fare clic su **Next > (Avanti)**.

Nota: Lasciare il campo (opzionale) Enter Gene Name (Immetti nome gene) vuoto. È possibile ricercare l'ID del gene/saggio al momento dell'ordine dei materiali (vedere la sezione [“Ordinazione dei materiali per l'esperimento”](#) a pagina 35).

2A. Set Up: Targets Targets Help ?

Instructions: Enter the number of targets to quantify in the reaction plate, then set up the assay for each target.

Set Up Targets * = Required

* How many **targets** do you want to quantify in the reaction plate?

For each target **assay** in the reaction plate, select whether to set up **standards**, enter a target name, select the **reporter** and **quencher** to use to detect the target, and select a **target color**. Optionally, enter a gene name, find Applied Biosystems gene expression assays, then select an assay to fill in the **Assay ID**.

Set Up Standards	* Enter Target Name	Reporter	Quencher	Color	(Optional) Enter Gene Name and Click "F..."	Assay ID
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="text" value="RNase P"/>	FAM	NFQ-MGB		<input type="text"/>	<input type="text"/>

3a
3b
3c
3d

Note

Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Selezionare la casella di controllo **Set Up Standards (Imposta standard)**. Applied Biosystems raccomanda l'impostazione di una curva standard per ogni saggio target nella piastra di reazione.
- Identificare ogni saggio target con un nome e un colore univoci. È possibile inserire fino a 100 caratteri nel campo Target Name (Nome target).
- Selezionare il colorante reporter utilizzato nel saggio target:
 - Selezionare **FAM** se il colorante FAMTM è collegato all'estremità 5' della sonda TaqMan utilizzata per rilevare il target.
 - Selezionare **JOE** se il colorante JOETM è collegato all'estremità 5' della sonda TaqMan utilizzata per rilevare il target.
 - Selezionare **VIC** se il colorante VIC[®] è collegato all'estremità 5' della sonda TaqMan utilizzata per rilevare il target.
 - Selezionare **SYBR** nel caso si utilizzi colorante SYBR[®] Green per rilevare il DNA a doppia elica.
- Selezionare il quencher utilizzato nel saggio target:
 - Selezionare **NFQ-MGB** se il quencher non fluorescente-minor groove binder è collegato all'estremità 3' della sonda TaqMan utilizzata per rilevare il target.
 - Selezionare **None (Nessuno)** nel caso si utilizzi il colorante SYBR Green.

IMPORTANTE! Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRATM come reporter o quencher con il sistema StepOneTM.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sul completamento della schermata Targets (Target), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Impostazione degli standard

Nella schermata Standards (Standard), immettere il numero di punti e di replicati per tutte le curve standard nella piastra di reazione. Per ogni curva standard, immettere la quantità iniziale e selezionare il fattore seriale.

Informazioni sull'esperimento di esempio

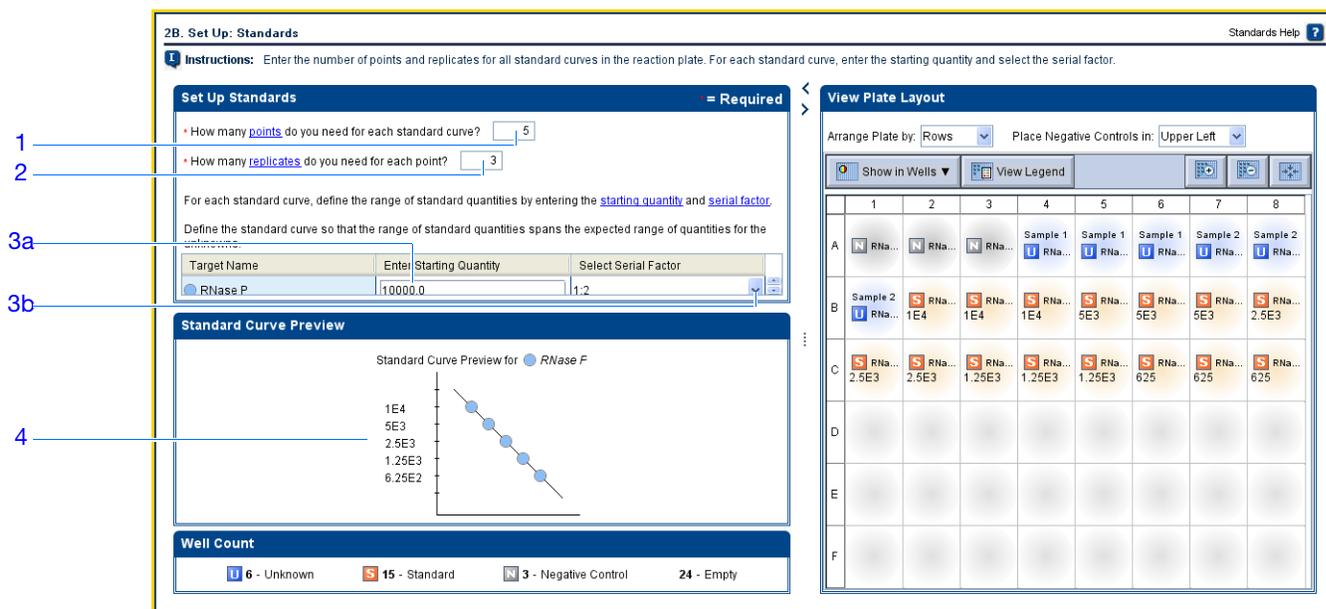
Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- Per il target (RNase P) viene impostata una sola curva standard. Lo standard utilizzato per le serie di diluizioni standard contiene quantità note del gene RNase P. È necessaria un'unica curva standard poiché è allo studio un singolo gene.
- Vengono utilizzati cinque punti nella curva standard.
- Vengono utilizzati tre replicati per ogni punto. I replicati sono reazioni identiche, contenenti gli stessi componenti e volumi di reazione.
- La quantità iniziale è di 10.000 copie e il fattore seriale è 1:2.

Note

Completamento della schermata Standards (Standard)

1. Fare clic sul campo **How many points do you need for each standard curve? (Quanti punti sono necessari per ogni curva standard?)**, quindi immettere **5**.
2. Fare clic sul campo **How many replicates do you need for each point? (Quanti replicati sono necessari per ogni punto?)**, quindi immettere **3**.
3. Definire il range delle quantità standard per il saggio RNase P:
 - a. Fare clic sul campo **Enter Starting Quantity (Immetti quantità iniziale)**, quindi immettere **10000**.
 - b. nel menu a discesa **Select Serial Factor (Seleziona fattore seriale)**, selezionare **1:2**.
4. Visualizzare nuovamente il pannello **Standard Curve Preview (Anteprima curva standard)**. La curva standard presenta i seguenti punti: 10000, 5000, 2500, 1250 e 625.
5. Fare clic su **Next > (Avanti)**.



Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Impostare una curva standard per ogni target nella piastra di reazione. I target vengono definiti precedentemente nella schermata **Targets (Target)** (“**Impostazione dei target**” a pagina 20).
- Immettere il numero di punti per ogni curva standard nella piastra di reazione. Applied Biosystems raccomanda almeno cinque punti di diluizione per ogni curva standard.
- Immettere il numero di reazioni identiche (replicati) per ogni punto della curva standard. Applied Biosystems raccomanda tre replicati per ogni punto.

Note

- Valutare con attenzione il range appropriato delle quantità standard per il saggio, poiché il range delle quantità standard influenza i calcoli dell'efficienza dell'amplificazione:
 - Per misurazioni più accurate dell'efficienza di amplificazione, utilizzare un ampio range di quantità degli standard, che vada dai 5 ai 6 log. Nel caso si specifichi un ampio range di quantità degli standard, è necessario utilizzare un prodotto PCR oppure un template maggiormente concentrato, come un clone cDNA.
 - In caso di limitata quantità di template cDNA e/o nel caso il target sia una trascrizione a basso numero di copie, oppure sia nota la sua presenza all'interno di un determinato range, potrebbe essere necessario un range ridotto delle quantità degli standard.
- Il fattore seriale viene utilizzato per calcolare le quantità in tutti i punti della curva standard. Qualora la quantità iniziale sia la più alta, selezionare un fattore di diluizione come 1:2, 1:3 e così via. Qualora la quantità iniziale sia la più bassa, selezionare un fattore di concentrazione come 2X, 3X e così via.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni su:

- Completamento della schermata Standards (Standard), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.
- Efficienza di amplificazione, fare riferimento alla Nota applicativa *Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays*.

Note

Impostazione dei campioni

Nella schermata Samples (Campioni), immettere il numero dei campioni, dei replicati e dei controlli negativi da includere nella piastra di reazione, immettere i nomi dei campioni, quindi selezionare le reazioni campione/target da impostare.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- Vengono utilizzati due campioni: DNA genomico proveniente da due popolazioni. I campioni contengono quantità non note di target (RNase P).
- Vengono utilizzati tre replicati. I replicati sono reazioni identiche, contenenti gli stessi componenti e volumi di reazione.
- Vengono utilizzati tre controlli negativi. Le reazioni di controllo negativo contengono acqua invece del campione e non dovrebbero amplificarsi.

Completamento della schermata Samples (Campioni)

1. Fare clic sul campo **How many samples do you want to test in the reaction plate? (Quanti campioni si desidera testare nella piastra di reazione?)**, quindi immettere **2**.

Nota: Il numero di righe nella tabella dei campioni si aggiorna con il numero immesso.

2. Fare clic sul campo **How many replicates do you need? (Quanti replicati sono necessari?)**, quindi immettere **3**.
3. Fare clic sul campo **How many negative controls do you need for each target assay? (Quanti controlli negativi sono necessari per ogni saggio target?)**, quindi immettere **3**.
4. Impostazione del campione 1:
 - a. Fare clic sul campo **Enter Sample Name (Immetti nome campione)**, quindi immettere **pop1** (per la popolazione 1).
 - b. Conservare l'impostazione predefinita nel campo Color (Colore).
5. Impostazione del campione 2:
 - a. Fare clic sul campo **Enter Sample Name (Immetti nome campione)**, quindi immettere **pop2** (per la popolazione 2).
 - b. Conservare l'impostazione predefinita nel campo Color (Colore).
6. Selezionare **All Sample/Target Reactions (Tutte le reazioni campione/target)** per testare tutti i target in tutti i campioni.

Note

7. Nel pannello Well Count (Conteggio pozzetti), verificare la presenza di:
 - 6 pozzetti sconosciuti **U**
 - 15 pozzetti standard **S**
 - 3 pozzetti di controllo negativo **N**
 - 24 pozzetti vuoti
8. Nella scheda View Plate Layout (Visualizza layout di piastra):
 - a. nel menu a discesa Arrange Plate (Disposizione piastra) , selezionare **Rows (Righe)** (predefinito).
 - b. nel menu a discesa Place Negative Controls (Posizionamento controlli negativi) , selezionare **Upper Left (In alto a sinistra)** (predefinito).
9. Fare clic su **Next > (Avanti)**.

The screenshot displays the '2C. Set Up: Samples' window. On the left, the 'Set Up Samples' panel includes instructions and three input fields for samples, replicates, and negative controls. Below these are two tables for sample names and colors. The 'View Plate Layout' panel on the right shows a 96-well plate grid with 'Rows' selected for arrangement and 'Upper Left' for negative controls. The 'Well Count' panel at the bottom shows the distribution of well types: 6 Unknown (U), 15 Standard (S), 3 Negative Control (N), and 24 Empty.

Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Identificare ogni campione con un nome e un colore univoci. È possibile inserire fino a 100 caratteri nel campo Sample Name (Nome campione).
- Immettere il numero di reazioni identiche (replicati) da impostare. Applied Biosystems raccomanda tre replicati per ogni reazione del campione.
- Immettere il numero di reazioni di controllo negativo da impostare. Applied Biosystems raccomanda tre reazioni di controllo negativo per ogni saggio target.
- Selezionare la combinazione delle reazioni campione/target desiderata:
 - Selezionare **All Sample/Target Reactions (Tutte le reazioni campione/target)** per testare tutti i target in tutti i campioni.

Note

- Selezionare **Specify Sample/Target Reactions (Specifica le reazioni campione/target)** per specificare i target da testare in ogni campione.

Nota: Nel Design Wizard, ogni reazione PCR può contenere un solo campione e un solo saggio target.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sul completamento della schermata Samples (Campioni), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Impostazione del metodo di esecuzione

Nella schermata Run Method (Metodo di esecuzione), riesaminare il volume di reazione e il profilo termico per il metodo di esecuzione predefinito. Se necessario, è possibile modificare il metodo di esecuzione predefinito o sostituirlo con uno proveniente dalla libreria Run Method (Metodo di esecuzione).

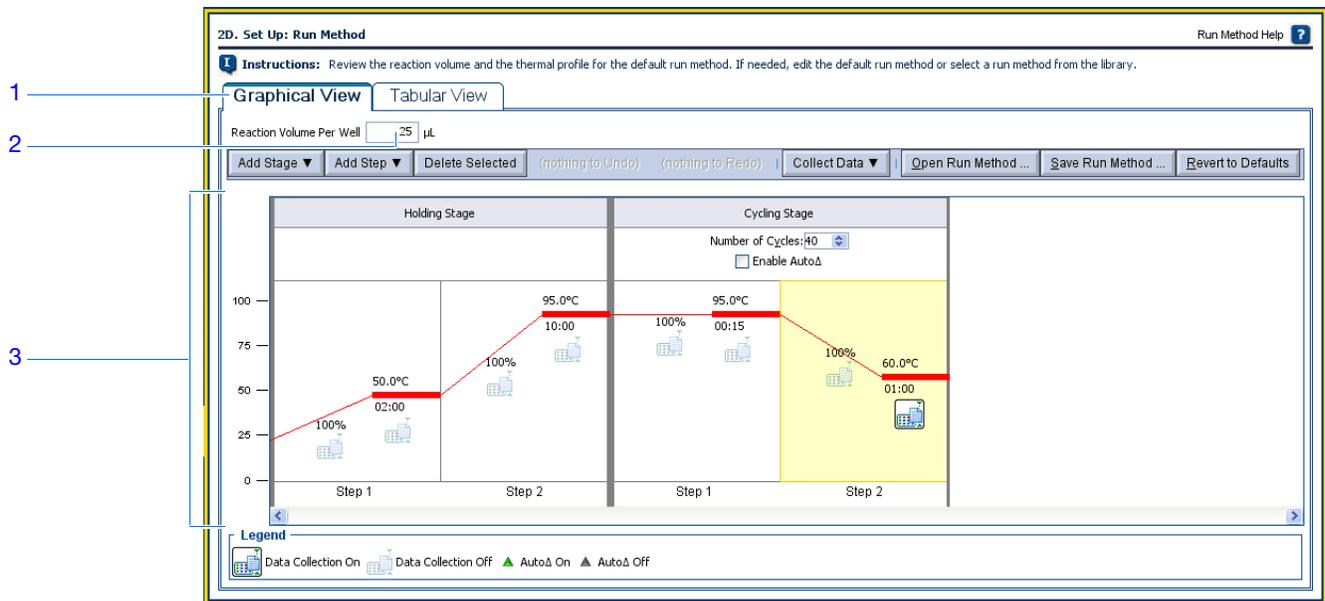
Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, viene utilizzato il metodo di esecuzione predefinito con una modifica: Il volume di reazione per pozzetto viene modificato da 20 µl a 25 µl.

rivisualizzazione della schermata Run Method (Metodo di esecuzione)

1. Fare clic sulla scheda **Graphical View (Visualizzazione grafica)** (predefinita) o sulla scheda **Tabular View (Visualizzazione tabellare)**.
2. Fare clic sul campo **Reaction Volume Per Well (Volume di reazione per pozzetto)**, quindi immettere **25 µl**.
3. Verificare che il profilo termico visualizzi le fasi di attesa e le fasi cicliche mostrate qui di seguito.
4. Fare clic su **Next > (Avanti)**.

Note



Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Immettere un numero da 10 a 30 per il volume di reazione/pozzetto. Il sistema StepOne supporta volumi di reazione da 10 a 30 µL.
- Visualizzare nuovamente il profilo termico:
 - Verificare che il profilo termico sia appropriato per i reagenti.
 - Nel caso sia in esecuzione una RT-PCR in 1 fase, includere una fase di trascrizione inversa.

Nel caso l'esperimento richieda un profilo termico diverso, modificare il profilo termico oppure sostituire il metodo di esecuzione con uno tratto dalla libreria Run Method (Metodo di esecuzione). La libreria Run Method (Metodo di esecuzione) è inclusa nel software StepOne.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulla libreria Run Method (Metodo di esecuzione) oppure sul completamento della schermata Run Method (Metodo di esecuzione), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Note

Verifica dell'impostazione della reazione

Nella schermata Reaction Setup (Impostazione reazione), selezionare il tipo di saggio (nel caso si utilizzino reagenti TaqMan), quindi rivedere i volumi calcolati per la preparazione delle reazioni PCR, delle serie di diluizioni standard e delle diluizioni del campione. Se necessario, è possibile modificare il volume di reazione, il volume di reazione in eccesso, le concentrazioni del componente, la concentrazione standard e/o la concentrazione del campione diluito.

IMPORTANTE! Effettuare i passaggi seguenti per ogni saggio target nella piastra di reazione.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- Viene utilizzato il saggio RNase P Applied Biosystems.
- Il volume di reazione per pozzetto è 25 µl.
- Il volume di reazione in eccesso è del 10%.
- I componenti della reazione sono i seguenti:
 - TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) oppure TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
 - Assay Mix RNase P (20X)
 - Campione o standard
 - Acqua
- La concentrazione standard nello stock è di 20.000 copie/µl.
- La concentrazione del campione diluito è 6,6 ng/µl.
- La concentrazione dello stock campione è 100 ng/µl.

Completamento della schermata Reaction Setup (Imposta reazione)

Completamento della scheda Reaction Mix Calculations (Calcoli miscela di reazione)

1. Selezionare la scheda **Reaction Mix Calculations (Calcoli miscela di reazione)** (predefinito).
2. Dal pannello Select Target (Seleziona target), selezionare **RNase P**.
3. nel menu a discesa Assay Type (Tipo saggio), selezionare **Inventoried/Made to Order (Inventariato/Prodotto su ordine)**.
4. Verificare che il campo Reaction Volume Per Well (Volume di reazione per pozzetto) visualizzi **25 µl**.
5. Verificare che il campo Excess Reaction Volume (Volume di reazione in eccesso) visualizzi **10%**.
6. Nel pannello Reactions for RNase P (Reazioni per RNase P):
 - a. Verificare che il campo Master Mix Concentration (Concentrazione Master Mix) visualizzi **2,0X**.

Note

- b. Verificare che il campo Assay Mix Concentration (Concentrazione Assay Mix) visualizzi **20,0X**.
- c. Rivedere i componenti e i volumi calcolati per le reazioni PCR:

Componente	Volume (µl) per 1 reazione
Master Mix (2,0X)	12,5
Assay Mix (20,0X)	1,3
Campione (10X) oppure Standard	2,5 [‡]
H ₂ O	8,8
Volume totale	25,0

[‡] Il campione o il volume standard è limitato al 10% del volume totale della reazione.

2E. Set Up: Reaction Setup > Reaction Mix Calculations

Instructions: For each target assay in the reaction plate, select the assay type (if using TaqMan reagents), then review the calculated volumes for preparing the standard dilution series, samples, and PCR reactions. If needed, edit the reaction volume, excess reaction volume, component concentrations, and/or stock concentrations. Click "Print Reaction Setup" to print instructions on how to prepare the PCR reactions.

Reaction Mix Calculations | Sample Dilution Calculations

Select Target: RNase P

Assay Type: Inventoried/Made to Order | Reaction Volume Per Well: 25 µL | Excess Reaction Volume: 10 %

Print Reaction Setup

Reactions for RNase P

Master Mix Concentration: 2.0 x | Assay Mix Concentration: 20.0 x

Component	Volume (µL) for 1 Reaction
Master Mix (2.0 x)	12.5
Assay Mix (20.0 x)	1.3
Sample (10 x) or Standard	2.5
H ₂ O	8.8
Total Volume	25.0

Standard Dilution Series for RNase P

Standard Concentration in Stock: 100.0 ng per µL

Dilution Point	Source	Source Volume (µL)	Diluent Volume (µL)	Total Volume (µL)	Standard Concentration (...
1 [100.0]	Stock	4.5	6.8	11.3	40.0

7. Nel pannello Standard Dilution Series for RNase P (Serie di diluizioni standard per RNase P):
 - a. Fare clic sul campo **Standard Concentration in Stock (Concentrazione standard nello stock)**, quindi immettere **20000**.
 - b. Fare clic sul campo delle unità, quindi immettere **copies (copie)** per µl.

Note

c. rivedere i volumi calcolati nella preparazione delle serie di diluizioni standard:

Punto di diluizione	Sorgente	Volume della sorgente (µl)	Volume del diluente (µl)	Volume totale (µl)	Concentrazione standard (copie/µl)
1 [10.000,0]	Stock	3,6	14,5	18,2	4000,0
2 [5.000,0]	Diluizione 1	9,1	9,1	18,2	2000,0
3 [2.500,0]	Diluizione 2	9,1	9,1	18,2	1000,0
4 [1.250,0]	Diluizione 3	9,1	9,1	18,2	500,0
5 [625,0]	Diluizione 4	9,1	9,1	18,2	250,0

7a
7b
7c

Completamento della scheda Sample Dilution Calculations (Calcoli diluizione campione)

1. Selezionare la scheda **Sample Dilution Calculations (Calcoli diluizione campione)**.
2. Fare clic sul campo **Diluted Sample Concentration (Concentrazione campione diluito) (10× per miscela di reazione)**, quindi immettere **6,6**.
3. Nel menu a discesa delle unità, selezionare **ng/µl** (predefinito).

Note

4. Verificare i volumi calcolati per le diluizioni del campione:

Nome campione	Concentrazione di stock (ng/ μ l)	Volume del campione (μ l)	Volume del diluente (μ l)	Volume totale del campione diluito (μ l)
pop1	100,0	1,0	14,2	15,2
pop2	100,0	1,0	14,2	15,2

Stampa istruzioni impostazione reazione

Stampare le istruzioni dettagliate dell'impostazione della reazione, quindi salvare le istruzioni per il [Capitolo 3, "Preparazione delle reazioni."](#)

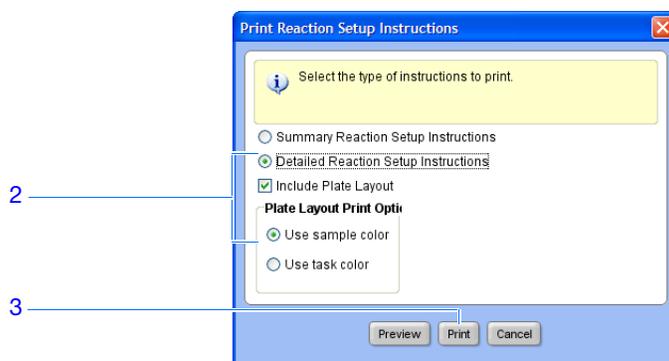
1. Fare clic su **Print Reaction Setup (Stampa impostazione reazione)**.

2. Nella finestra di dialogo, selezionare:

- **Detailed Reaction Setup Instructions (Istruzioni dettagliate impostazione della reazione)**
- **Include Plate Layout (Includi layout piastra)**
- **Use sample color (Utilizza colore campione)**

3. Fare clic su **Print (Stampa)**.

Note _____



4. Nella finestra di dialogo Print (Stampa), selezionare le opzioni della stampante e di stampa, quindi fare clic su **OK**.
5. Fare clic su **Next > (Avanti)**.

Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Nel caso si utilizzino reagenti TaqMan, selezionare il tipo di saggio utilizzato:
 - Selezionare **Inventoried/Made to Order (Inventariato/Prodotto su ordine)** nel caso si utilizzino saggi TaqMan® Gene Expression Applied Biosystems (Inventoriatati oppure prodotti su ordine) oppure saggi Custom TaqMan® Gene Expression Applied Biosystems.
 - Selezionare **Custom (Personalizzati)** per creare i propri saggi con il software Primer Express®.
- Immettere un numero da 10 a 30 per il volume di reazione/pozzetto. Il sistema StepOne supporta volumi di reazione da 10 a 30 µl.
- Includere il volume di reazione in eccesso per tenere conto della perdita che si verifica durante il pipettaggio. Applied Biosystems raccomanda un volume di reazione in eccesso del 10% almeno.
- Verificare le concentrazioni della miscela di reazione per ciascun target. Se necessario:
 - Per i reagenti TaqMan, modificare le concentrazioni della miscela Master Mix e della miscela di saggi.
 - Per i reagenti SYBR Green, modificare le concentrazioni della Master Mix, del forward primer e del reverse primer.
 - Per la RT-PCR in 1 fase, modificare la concentrazione della trascrittasi inversa.
- Verificare i componenti della miscela di reazione per ogni target:
 - Nel caso siano in esecuzione reazioni PCR veloci, verificare che venga utilizzata una Master Mix veloce nelle reazioni PCR.
 - Nel caso siano in esecuzione reazioni PCR standard, verificare che venga utilizzata una Master Mix standard nelle reazioni PCR.
 - Per la RT-PCR in 1 fase, verificare che nelle reazioni PCR sia stata inclusa la trascrittasi inversa e che venga utilizzato un buffer specifico.

Note

- Verificare i calcoli delle serie di diluizioni standard per ogni target. Se necessario, modificare la concentrazione standard nello stock (incluso le unità).

Nota: Per il campo Standard Concentration in Stock units (Unità di concentrazione standard nello stock), è possibile selezionare **ng** oppure **µg** nel menu a discesa oppure è possibile immettere un'altra unità nel campo (ad esempio, **copies (copie)**, **IU (UI)**, [International Units (Unità internazionali)], **nmol**, **pg** e così via). La tabella si aggiorna in base alle immissioni.

- Verificare i calcoli della diluizione del campione per ogni campione. Se necessario, modificare la concentrazione del campione diluito (incluso le unità) e la concentrazione dello stock.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni su:

- Completamento della schermata Reaction Setup (Imposta reazione), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.
- Saggi Applied Biosystems, fare riferimento al:
 - *TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*
 - *Custom TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*.

Ordinazione dei materiali per l'esperimento

Nella schermata Materials List (Elenco materiali), rivedere l'elenco dei materiali raccomandati per la preparazione della piastra di reazione PCR.

È possibile ordinare i materiali raccomandati presso lo Store di Applied Biosystems. Creare un carrello per l'acquisto, aggiungere gli articoli all'elenco acquisti, quindi eseguire il log in per inoltrare l'ordine. È necessaria una connessione Internet senza restrizioni per accedere allo Store di Applied Biosystems.

Nota: Il software StepOne raccomanda di ordinare i materiali in base all'esperimento creato. Si suppone che l'utente disegni il proprio esperimento, ordini i materiali, quindi prepari la piastra di reazione ([Capitolo 3](#)) ed esegua ([Capitolo 4](#)) la sessione di analisi all'arrivo dei materiali.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, i materiali raccomandati sono i seguenti:

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) oppure TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
- Saggio RNase P Applied Biosystems

Nota: Non è disponibile il saggio Human RNase P-MGB-Probe TaqMan® Gene Expression. È possibile tuttavia ordinarlo come saggio Custom TaqMan® Gene Expression (n.di cat. 4331348). Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRA™ come reporter o quencher con il sistema StepOne™.

Completamento della schermata Ordering Materials (Ordine materiali)

1. Cercare il saggio target presso lo Store di Applied Biosystems:
 - a. Verificare che il proprio computer sia connesso a Internet.
 - b. Fare clic sul campo **Enter Gene Name (Immetti nome gene)**, immettere **RNase P**, quindi fare clic su **Find Assay (Cerca saggio)**.
 - c. Nella finestra di dialogo Find Assay Results (Risultati ricerca saggio), selezionare il proprio saggio.
 - d. Fare clic su **Apply Assay Selection (Applica selezione saggio)**.
2. Completare il pannello Experiment Materials List (Elenco materiali esperimento):
 - a. nel menu a discesa Display (Visualizza), selezionare **All Items (Tutte le voci)** (predefinito), quindi rivedere i materiali raccomandati. Se necessario, utilizzare la barra di scorrimento sulla destra per visualizzare tutte le voci.

Note

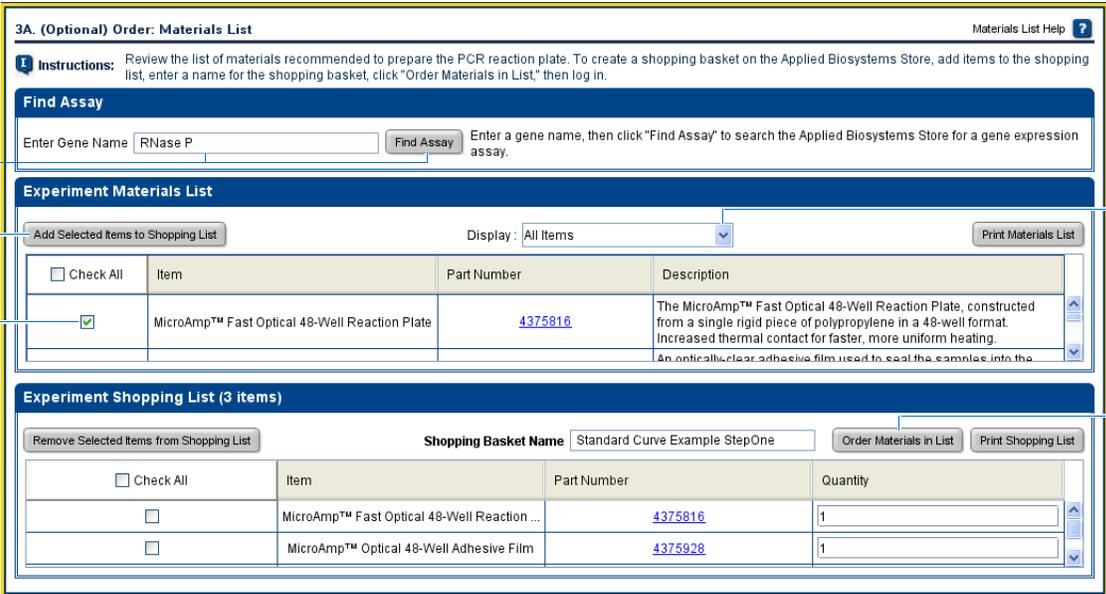
b. Selezionare la casella di controllo adiacente a ciascuna delle seguenti voci:

- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) oppure TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG
- Saggio RNase P Applied Biosystems

Nota: Per ulteriori informazioni su una voce specifica, fare clic sul link del numero di catalogo per collegarsi allo Store di Applied Biosystems. Nella pagina home, immettere il numero di catalogo nel campo Search (Ricerca), quindi fare clic su  **Go (Vai)**.

c. Fare clic su **Add Selected Items to Shopping List (Aggiungi gli articoli selezionati all'elenco acquisti)**.

3. Verificare che l'elenco acquisti dell'esperimento contenga i materiali desiderati e che le quantità siano corrette, quindi fare clic su **Order Materials in List (Ordina i materiali in elenco)**.



3A. (Optional) Order: Materials List Materials List Help ?

Instructions: Review the list of materials recommended to prepare the PCR reaction plate. To create a shopping basket on the Applied Biosystems Store, add items to the shopping list, enter a name for the shopping basket, click "Order Materials in List," then log in.

Find Assay

Enter Gene Name: Enter a gene name, then click "Find Assay" to search the Applied Biosystems Store for a gene expression assay.

Experiment Materials List

Display:

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Description
<input checked="" type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate	4375816	The MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, constructed from a single rigid piece of polypropylene in a 48-well format. Increased thermal contact for faster, more uniform heating. An optically clear adhesive film used to seal the samples into the

Experiment Shopping List (3 items)

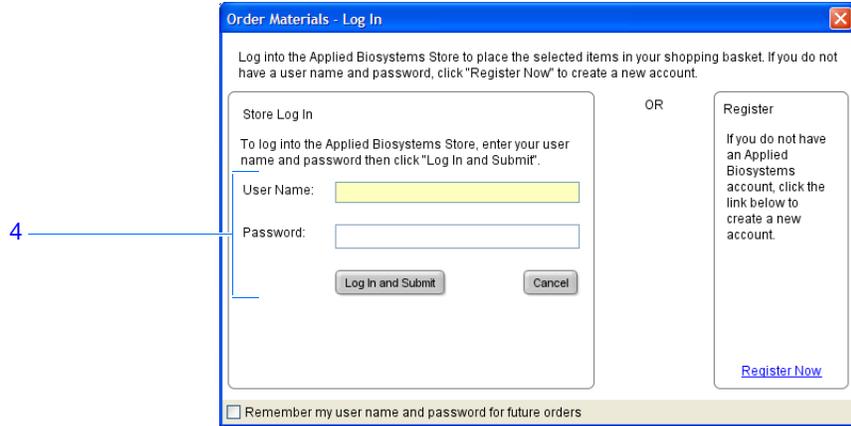
Shopping Basket Name:

<input type="checkbox"/> Check All	Item	Part Number	Quantity
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction ...	4375816	<input type="text" value="1"/>
<input type="checkbox"/>	MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film	4375928	<input type="text" value="1"/>

4. Nella finestra di dialogo Order Materials - Log In (Ordina materiali – Entra), immettere il nome utente e la password per lo Store di Applied Biosystems, quindi fare clic su **Login and Submit (Entra e inoltra)**.

Nota: Nel caso non si posseda un account con lo Store di Applied Biosystems, fare clic su **Register Now (Registrati subito)** per creare un account.

Note



5. Dopo aver effettuato l'ordine, fare clic su **Finish Designing Experiment (Termina il disegno dell'esperimento)**.

Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Verificare che il proprio computer abbia una connessione Internet senza restrizioni.
- Applied Biosystems raccomanda i seguenti browser e versioni Adobe® Acrobat® Reader per utilizzare il sito web Applied Biosystems:

Sistema operativo desktop	Netscape® Navigator	Microsoft® Internet Explorer	Adobe® Acrobat® Reader
Windows® 98/NT/2000	v6.x o successiva	v6.x o successiva	v4.0 o successiva
Macintosh® OS 9 o successiva	v6.x o successiva	v5.2 o successiva	v4.0 o successiva

Nota: Verificare che cookie e Java Script siano attivati per un corretto funzionamento del sito web.

- Selezionare tutti i materiali necessari per l'esperimento e aggiungerli all'elenco acquisti.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sul completamento della schermata Materials List (Elenco materiali), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Note

Termine del flusso di lavoro del Design Wizard

Per terminare il flusso di lavoro del Design Wizard, rivedere il layout della piastra, quindi selezionare una opzione di uscita.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Il software StepOne seleziona automaticamente le posizioni dei pozzetti nella piastra di reazione. Nell'esperimento di esempio con curva standard:

- I pozzetti sono disposti come mostrato qui di seguito.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N RNase P	N RNase P	N RNase P	U RNase P pop1	U RNase P pop1	U RNase P pop1	U RNase P pop2	U RNase P pop2
B	U RNase P pop2	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 2.5E3
C	S RNase P 2.5E3	S RNase P 2.5E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 625	S RNase P 625	S RNase P 625
D								
E								
F								

- L'esperimento viene salvato allo stato in cui si trova e viene chiuso.

Nota: Per l'esperimento di esempio, non eseguire la sessione di analisi in questo stadio.

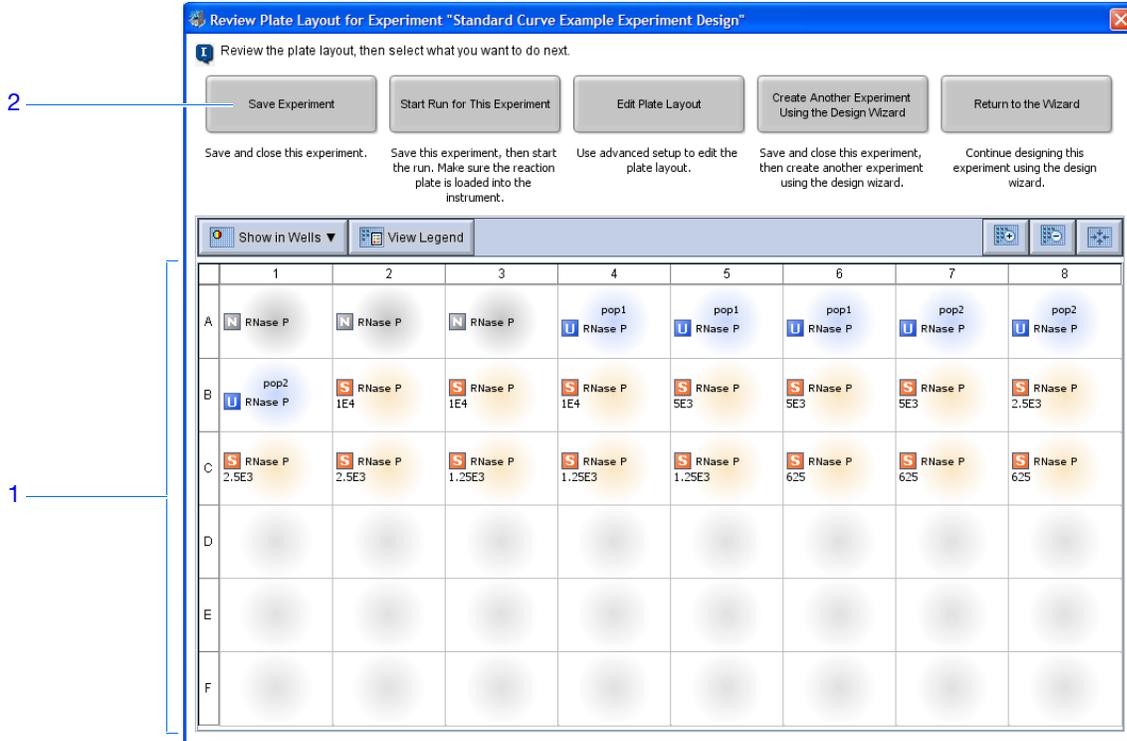
Termine del Design Wizard

1. Nella finestra Review Plate for Experiment (rivisualizzazione piastra per esperimento), rivedere il layout della piastra. Verificare la presenza di:
 - 6 pozzetti sconosciuti **U**
 - 15 pozzetti standard **S**
 - 3 pozzetti di controllo negativo **N**
 - 24 pozzetti vuoti

Nota: Se il layout di piastra non è corretto, fare clic su **Return to the Wizard (Ritorna al Wizard)** e verificare i valori immessi.

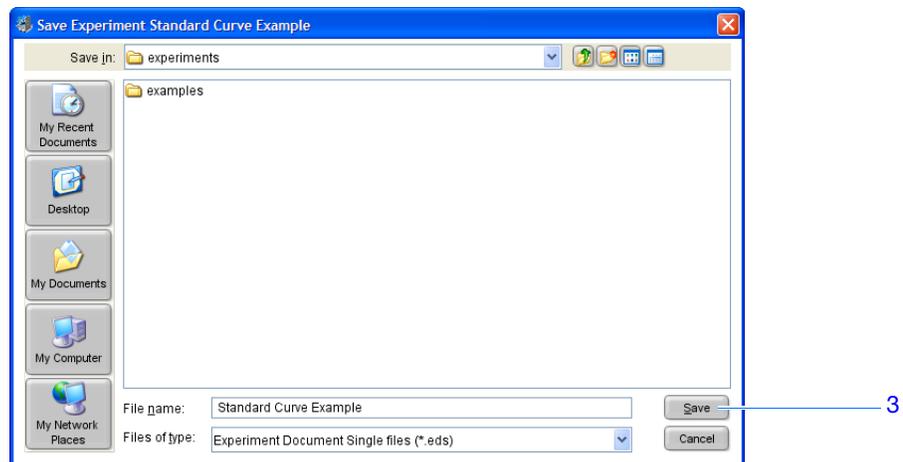
2. Fare clic su **Save Experiment (Salva esperimento)**.

Note



3. Nella finestra di dialogo Save Experiment (Salva esperimento), fare clic su **Save (Salva)** per accettare il nome file predefinito e il posizionamento. L'esperimento di esempio viene salvato e chiuso e l'utente viene riportato alla schermata Home.

Nota: Come impostazione predefinita, l'esperimento di esempio viene salvato nella cartella Applied Biosystems\StepOne System\experiments.



Note

Istruzioni per il disegno

Per creare il proprio esperimento con curva standard, procedere come indicato di seguito.

- Nella finestra Review Plate for Experiment (rivisualizzazione piastra per esperimento), selezionare l'opzione di uscita appropriata:
 - Fare clic su **Save Experiment (Salva esperimento)** nel caso si desideri salvare e chiudere l'esperimento senza ulteriori modifiche o senza avviarne l'esecuzione.
 - Fare clic su **Start Run for This Experiment (Avvia esecuzione per questo esperimento)** nel caso si desideri salvare l'esperimento e avviarne l'esecuzione. Verificare che la piastra di reazione sia caricata nello strumento.
 - Fare clic su **Edit Plate Layout (Modifica layout piastra)** nel caso si desideri utilizzare il flusso di lavoro Advanced Setup (Impostazione avanzata) per modificare il layout della piastra.
 - Fare clic su **Create Another Experiment Using the Design Wizard (Crea un altro esperimento utilizzando il Design Wizard)** nel caso si desideri salvare e chiudere l'esperimento e quindi creare un altro esperimento utilizzando il Design Wizard.
 - Fare clic su **Return to the Wizard (Ritorna al Wizard)** nel caso si desideri effettuare modifiche utilizzando il Design Wizard.
- Come impostazione predefinita, gli esperimenti vengono salvati nella cartella Applied Biosystems\StepOne System\experiments. Per modificare la:
 - Posizione di archiviazione per uno specifico esperimento, individuare la posizione desiderata utilizzando la finestra di dialogo Save Experiment (Salva esperimento).
 - Posizione di archiviazione predefinita, selezionare **Tools (Strumenti) ▶ Preferences (Preferenze)**, quindi selezionare la scheda **General (Generale)** (predefinito). Nel campo Default Data Folder (Cartella dati predefinita), sfogliare fino a identificare la posizione desiderata.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sull'utilizzo del flusso di lavoro Advanced Setup (Impostazione avanzata), vedere ["Flusso di lavoro impostazione avanzata" a pagina 110](#).

Note

3

Preparazione delle reazioni

Questo capitolo comprende i paragrafi:

- Descrizione generale 42
- Preparazione delle diluizioni del campione 43
- Preparazione delle serie di diluizioni standard 45
- Preparazione della miscela di reazione 47
- Preparazione della piastra di reazione 50

Nota: Per ulteriori informazioni sugli argomenti trattati in questa guida, accedere alla voce Help (Guida) nel software del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System premendo **F1**, facendo clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionando **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

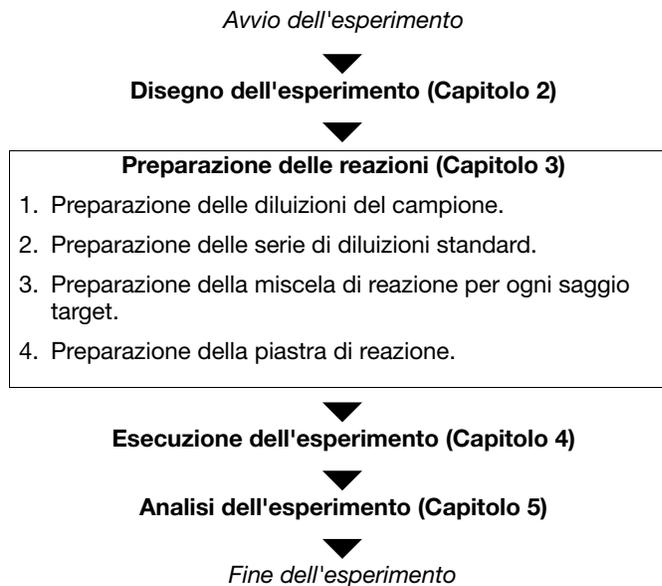
Note

Descrizione generale

Questo capitolo spiega come preparare le reazioni PCR per l'esperimento dell'esempio con curva standard e fornisce le linee guida per la preparazione delle reazioni PCR relativamente al proprio esperimento con curva standard.

Flusso di lavoro dell'esperimento di esempio

Il flusso di lavoro per la preparazione delle reazioni PCR dell'esperimento di esempio fornito con questa guida introduttiva è mostrato qui di seguito.



Note

Preparazione delle diluizioni del campione

Eseguire le diluizioni del campione prima dell'aggiunta dei campioni nella miscela di reazione finale. Diluire i campioni utilizzando i volumi calcolati precedentemente dal software StepOne™ ("Completamento della scheda [Sample Dilution Calculations](#) (Calcoli diluizione campione)" a pagina 31).

Informazioni sull'esperimento di esempio

Per l'esperimento di esempio con curva standard:

- Le diluizioni del campione sono necessarie in quanto il volume del campione è limitato al 10% del volume di reazione totale nel software StepOne. Il volume di reazione totale è 25 µl/reazione, dunque il volume del campione è 2,5 µl/reazione.
- La concentrazione di stock è 100 ng/µl. Dopo aver diluito il campione nel rispetto della tabella relativa ai calcoli delle diluizioni dei campioni, il campione avrà una concentrazione di 6,6 ng/µl. Questa è una concentrazione 10X quando si aggiungono 2,5 µl al volume della miscela di reazione finale di 25 µl. Si otterrà una concentrazione 1X nella reazione finale.
- I volumi calcolati dal software sono:

Nome campione	Concentrazione di stock (ng/µl)	Volume del campione (µl)	Volume del diluente (µl)	Volume totale del campione diluito (µl)
pop1	100,0	1,0	14,2	15,2
pop2	100,0	1,0	14,2	15,2

Materiali necessari

- Acqua per la diluizione del campione
- Provette per microcentrifuga
- Pipettatori
- Puntali per pipette
- Stock campione
- Vortexer
- Centrifuga

Preparazione delle diluizioni del campione

1. Etichettare una diversa provetta per microcentrifuga per ogni campione diluito:
 - **Popolazione 1**
 - **Popolazione 2**
2. Aggiungere il volume richiesto di acqua (diluente) ad ogni provetta vuota:

Provetta	Nome campione	Volume del diluente (µl)
1	Popolazione 1	14,2
2	Popolazione 2	14,2

Note

3. Aggiungere il volume richiesto dello stock del campione ad ogni provetta:

Provetta	Nome campione	Volume del campione (μ l)
1	Popolazione 1	1,0
2	Popolazione 2	1,0

4. Agitare su Vortex ogni campione diluito da 3 a 5 secondi, quindi centrifugare brevemente le provette.
5. Collocare su ghiaccio i campioni diluiti fino alla preparazione della piastra di reazione.

Istruzioni per la preparazione

Per preparare il proprio esperimento con curva standard:

- Le diluizioni del campione potrebbero essere necessarie poiché il volume del campione è limitato al 10% del volume di reazione totale nel software StepOne. È necessario eseguire le diluizioni del campione prima dell'aggiunta dei campioni nella miscela di reazione finale.
- Per prestazioni ottimali dei saggi TaqMan[®] Gene Expression oppure dei saggi Custom TaqMan[®] Gene Expression, utilizzare da 10 a 100 ng di template DNA per una reazione di 20 μ l. Per i reagenti veloci, Applied Biosystems raccomanda 10 ng.
- Utilizzare un tampone TE oppure acqua per diluire il campione.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sui saggi Applied Biosystems, fare riferimento a:

- *TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan[®] Gene Expression Assays Protocol*.

Preparazione delle serie di diluizioni standard

Preparare le serie di diluizioni standard utilizzando i volumi calcolati precedentemente dal software StepOne ("Completamento della scheda Reaction Mix Calculations (Calcoli miscela di reazione)" a pagina 29).

Informazioni sull'esperimento di esempio

Per eseguire l'esperimento di esempio con curva standard:

- La concentrazione standard nello stock è di 20.000 copie/μl.
- I volumi calcolati dal software sono:

Punto di diluizione	Sorgente	Volume della sorgente (μl)	Volume del diluente (μl)	Volume totale (μl)	Concentrazione standard (copie/μl)
1 [10.000,0]	Stock	3,6	14,5	18,2	4000,0
2 [5.000,0]	Diluizione 1	9,1	9,1	18,2	2000,0
3 [2.500,0]	Diluizione 2	9,1	9,1	18,2	1000,0
4 [1.250,0]	Diluizione 3	9,1	9,1	18,2	500,0
5 [625,0]	Diluizione 4	9,1	9,1	18,2	250,0

Materiali necessari

- Acqua di diluizione degli standard
- Provette per microcentrifuga
- Pipettatori
- Puntali per pipette
- Stock standard
- Vortexer
- Centrifuga

Preparazione delle serie di diluizioni standard per saggio RNase P

1. Etichettare una provetta per microcentrifuga separata per ogni standard:
 - RNase P Std. 1
 - RNase P Std. 2
 - RNase P Std. 3
 - RNase P Std. 4
 - RNase P Std. 5
2. Aggiungere il volume richiesto di acqua (diluente) ad ogni provetta vuota:

Provetta	Nome standard	Volume di diluente da aggiungere (μl)
1	RNase P Std. 1	14,5
2	RNase P Std. 2	9,1

Note

Provetta	Nome standard	Volume di diluente da aggiungere (µl)
3	RNase P Std. 3	9,1
4	RNase P Std. 4	9,1
5	RNase P Std. 5	9,1

3. Preparazione della diluizione 1 nella provetta RNase P Std. 1:
 - a. Agitare su Vortex lo stock da 3 a 5 secondi, quindi centrifugare brevemente la provetta.
 - b. Utilizzando un nuovo puntale per pipette, aggiungere 3,6 µl dello stock alla provetta RNase P Std. 1.
 - c. Agitare con Vortex lo Std. 1 da 3 a 5 secondi, quindi centrifugare brevemente la provetta.
4. Preparazione della diluizione 2 nella provetta RNase P Std. 2:
 - a. Utilizzando un nuovo puntale per pipette, aggiungere 9,1 µl della diluizione 1 alla provetta RNase P Std. 2.
 - b. Agitare con Vortex lo Std. 2 da 3 a 5 secondi, quindi centrifugare brevemente la provetta.
5. Preparazione della diluizione 3 nella provetta RNase P Std. 3:
 - a. Utilizzando un nuovo puntale per pipette, aggiungere 9,1 µl della diluizione 2 alla provetta RNase P Std. 3.
 - b. Agitare con Vortex lo Std. 3 da 3 a 5 secondi, quindi centrifugare brevemente la provetta.
6. Preparazione della diluizione 4 nella provetta RNase P Std. 4:
 - a. Utilizzando un nuovo puntale per pipette, aggiungere 9,1 µl della diluizione 3 alla provetta RNase P Std. 4.
 - b. Agitare con Vortex lo Std. 4 da 3 a 5 secondi, quindi centrifugare brevemente la provetta.

Note

7. Preparazione della diluizione 5 nella provetta RNase P Std. 5:
 - a. Utilizzando un nuovo puntale per pipette, aggiungere 9,1 μ l della diluizione 4 alla provetta RNase P Std. 5.
 - b. Agitare con Vortex lo Std. 5 da 3 a 5 secondi, quindi centrifugare brevemente la provetta.
8. Collocare su ghiaccio gli standard fino alla preparazione della piastra di reazione.

Istruzioni per la preparazione

Per preparare il proprio esperimento con curva standard:

- Gli standard sono un elemento critico per una analisi accurata dei dati della sessione.
- Errori eventuali o la mancanza di accuratezza nella preparazione delle diluizioni influenzano in modo diretto la qualità dei risultati.
- La qualità dei pipettatori e dei puntali e la cura nella misurazione e nella miscelazione delle diluizioni influenzano l'accuratezza.
- Utilizzare un tampone TE oppure acqua per la diluizione degli standard.

Preparazione della miscela di reazione

Preparare la miscela di reazione utilizzando i componenti e i volumi calcolati precedentemente dal software StepOne (“[Completamento della scheda Reaction Mix Calculations \(Calcoli miscela di reazione\)](#)” a pagina 29).

Nota: Il software calcola tutti i componenti per le reazioni PCR. Comunque, nella preparazione della miscela di reazione in questa sezione, includere unicamente la Master Mix, l'Assay Mix e acqua. Aggiungere il campione o lo standard al momento della preparazione della piastra di reazione (vedere “[Preparazione della piastra di reazione](#)” a pagina 50).

Informazioni sull'esperimento di esempio

Per eseguire l'esperimento di esempio con curva standard:

- I componenti della miscela di reazione sono i seguenti:
 - TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2X) oppure TaqMan[®] 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG
 - Assay Mix RNase P (20X)
 - Acqua

Note

- I volumi calcolati dal software sono:

Componente	Volume (µl) per 1 reazione
Master Mix (2,0X)	12,5
Assay Mix (20,0X)	1,3
H ₂ O	8,8
Volume totale	22,6

Nota: Il campione o lo standard non viene aggiunto in questa fase.

Materiali necessari

- Provette per microcentrifuga
- Pipettatori
- Puntali per pipette
- Componenti della miscela di reazione (elencati in precedenza)
- Centrifuga

Preparazione della miscela di reazione



ATTENZIONE

PERICOLO CHIMICO. TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2X) può provocare irritazione degli occhi e della pelle. L'esposizione può provocare problemi in caso di ingestione o inalazione. Leggere le MSDS e attenersi rigorosamente alle istruzioni relative alla manipolazione di questa sostanza. Indossare un'adeguata protezione oculare, indumenti e guanti di protezione.



ATTENZIONE

PERICOLO CHIMICO. TaqMan[®] 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG può provocare irritazione degli occhi e della pelle. L'esposizione può provocare problemi in caso di ingestione o inalazione. Leggere le MSDS e attenersi rigorosamente alle istruzioni relative alla manipolazione di questa sostanza. Indossare un'adeguata protezione oculare, indumenti e guanti di protezione.

1. Etichettare una provetta della dimensione appropriata per la miscela di reazione:
Miscela di reazione RNase P.

Note

2. Per il saggio RNase P, aggiungere nella provetta i volumi richiesti di ogni componente:

Componente	Volume (µl) per 1 reazione	Volume (µl) per 24 reazioni (più 10% in eccesso)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) oppure TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	12,5	330,0
Assay Mix RNase P (20X)	1,3	34,3
Acqua	8,8	232,3
Volume totale della miscela di reazione	22,6	596,6

3. Mescolare la miscela di reazione pipettando con cautela su e giù, quindi tappare la provetta.
4. Centrifugare la provetta brevemente per rimuovere le bolle d'aria.
5. Collocare su ghiaccio la miscela di reazione fino alla preparazione della piastra di reazione.

Istruzioni per la preparazione

Per preparare il proprio esperimento con curva standard:

- Nel caso il proprio esperimento includa più di un singolo saggio target, preparare la miscela di reazione per ogni saggio target separatamente.
- Includere volume in eccesso nei propri calcoli allo scopo di compensare le perdite che si verificano durante il trasferimento dei reagenti. Applied Biosystems raccomanda un volume in eccesso del 10% almeno.
- Includere tutti i componenti necessari.
- Preparare i reagenti secondo le istruzioni del produttore.
- Proteggere l'Assay Mix dalla luce, nel congelatore, fino al momento dell'utilizzo. Una eccessiva esposizione alla luce può provocare effetti non desiderati sulle sonde fluorescenti.
- Prima dell'utilizzo:
 - Mescolare bene la Master Mix agitando la bottiglia.
 - Riportare l'Assay Mix in sospensione agitando su Vortex, quindi centrifugare brevemente la provetta.
 - Scongela eventuali campioni congelati collocandoli su ghiaccio. Una volta scongelati, riportare in sospensione i campioni agitandoli su Vortex, quindi centrifugare brevemente le provette.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulla preparazione della miscela di reazione, fare riferimento al protocollo appropriato per i reagenti utilizzati nelle reazioni PCR:

- *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*.

Note

Preparazione della piastra di reazione

Preparare le reazioni per ogni gruppo di replicati, quindi trasferirle alla piastra di reazione. Utilizzare il layout di piastra visualizzato nel software StepOne.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Per eseguire l'esperimento di esempio con curva standard:

- Viene utilizzata una MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate.
- Il volume di reazione è 25 µl/pozzetto.
- La piastra di reazione contiene:
 - 6 pozzetti sconosciuti **U**
 - 15 pozzetti standard **S**
 - 3 pozzetti di controllo negativo **N**
 - 24 pozzetti vuoti
- Viene utilizzato il layout di piastra generato automaticamente dal software StepOne:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N RNase P	N RNase P	N RNase P	U RNase P pop1	U RNase P pop1	U RNase P pop1	U RNase P pop2	U RNase P pop2
B	U RNase P pop2	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 1E4	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 5E3	S RNase P 2.5E3
C	S RNase P 2.5E3	S RNase P 2.5E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 1.25E3	S RNase P 625	S RNase P 625	S RNase P 625
D								
E								
F								

Materiali necessari

- Provette per microcentrifuga
- Pipettatori
- Puntali per pipette
- Miscela di reazione RNase P (da [pagina 48](#))
- Acqua
- Standard (da [pagina 45](#))
- Campioni (da [pagina 43](#))
- MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate
- MicroAmp™ Optical 48-Well Adhesive Film
- Centrifuga

Note

Preparazione della piastra di reazione

1. Preparazione delle reazioni di controllo negativo per il target:

- a. Aggiungere i volumi della miscela di reazione elencati qui di seguito a una provetta di dimensione appropriata.

Provetta	Miscela di reazione	Volume della miscela di reazione (µl)	Volume acqua (µl)
1	Miscela di reazione RNase P	74,6	8,3

- b. Mescolare la reazione pipettando con cautela su e giù, quindi tappare la provetta.
- c. Centrifugare la provetta brevemente per rimuovere le bolle d'aria.
- d. Aggiungere 25 µl della reazione di controllo negativo ai pozzetti appropriati nella piastra di reazione.

2. Per ogni gruppo di replicati, preparare le reazioni standard:

- a. Aggiungere i volumi della miscela di reazione e degli standard elencati qui di seguito a provette di dimensione appropriata.

Provetta	Reazioni standard	Miscela di reazione	Volume della miscela di reazione (µl)	Standard	Volume standard (µl)
1	RNase P Std 1	Miscela di reazione RNase P	74,6	RNase P Std 1	8,3
2	RNase P Std 2	Miscela di reazione RNase P	74,6	RNase P Std 2	8,3
3	RNase P Std 3	Miscela di reazione RNase P	74,6	RNase P Std 3	8,3
4	RNase P Std 4	Miscela di reazione RNase P	74,6	RNase P Std 4	8,3
5	RNase P Std 5	Miscela di reazione RNase P	74,6	RNase P Std 5	8,3

- b. Mescolare le reazioni pipettando con cautela su e giù, quindi tappare le provette.
- c. Centrifugare le provette brevemente per rimuovere le bolle d'aria.
- d. Aggiungere 25 µl della reazione standard ai pozzetti appropriati nella piastra di reazione.

Note

3. Per ogni gruppo di replicati, preparare le reazioni per gli sconosciuti:
- Aggiungere i volumi della miscela di reazione e del campione elencati qui di seguito a provette di dimensione appropriata.

Provetta	Reazione sconosciuta	Miscela di reazione	Volume della miscela di reazione (μl)	Campione	Volume campione (μl)
1	RNase P pop1	Miscela di reazione RNase P	74,6	pop1	8,3
2	RNase P pop2	Miscela di reazione RNase P	74,6	pop2	8,3

- Mescolare le reazioni pipettando con cautela su e giù, quindi tappare le provette.
 - Centrifugare le provette brevemente per rimuovere le bolle d'aria.
 - Aggiungere 25 μl della reazione sconosciuta (campione) ai pozzetti appropriati nella piastra di reazione.
- Sigillare la piastra di reazione utilizzando una pellicola ottica adesiva.
 - Centrifugare la piastra di reazione brevemente per rimuovere le bolle d'aria.
 - Collocare su ghiaccio e al riparo dalla luce la piastra di reazione fino all'esecuzione della sessione di analisi.

Istruzioni per la preparazione

Per preparare il proprio esperimento con curva standard:

- Accertarsi di utilizzare i materiali di consumo appropriati.
- Accertarsi che la distribuzione delle reazioni PCR corrisponda al layout di piastra visualizzato nel software StepOne. È possibile inoltre:
 - Accettare il layout di piastra generato automaticamente dal software.
 - *oppure*
 - Utilizzare il flusso di lavoro dell'impostazione avanzata per modificare il layout di piastra nel software.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni su:

- Preparazione della piastra di reazione, fare riferimento al protocollo appropriato per i reagenti utilizzati nelle reazioni PCR:
 - *TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
 - *Custom TaqMan® Gene Expression Assays Protocol*
- Materiali di consumo, vedere la sezione [“Materiali di consumo supportati” a pagina 3](#).
- Utilizzo del flusso di lavoro dell'impostazione avanzata per modificare il layout di piastra, vedere la sezione [“Flusso di lavoro impostazione avanzata” a pagina 110](#).

Note

4

Esecuzione dell'esperimento

Questo capitolo comprende i paragrafi:

■ Descrizione generale	54
■ Preparazione per l'esecuzione	55
■ (Opzionale) Abilitazione delle notifiche	57
■ Avvio dell'esecuzione	59
■ Monitoraggio dell'esecuzione	62
■ Download della piastra di reazione e trasferimento dei dati	71

Nota: Per ulteriori informazioni sugli argomenti trattati in questa guida, accedere alla voce Help (Guida) nel software del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System premendo **F1**, facendo clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionando **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

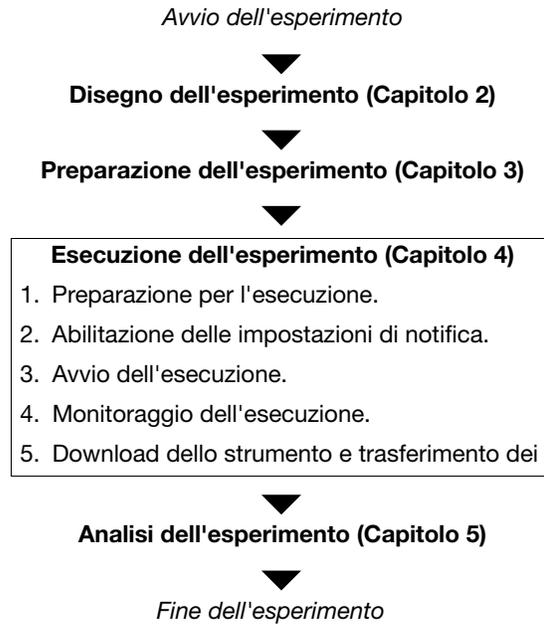
Note

Descrizione generale

Questo capitolo spiega come eseguire una sessione analitica sul sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System.

Flusso di lavoro dell'esperimento di esempio

Il flusso di lavoro per l'esecuzione dell'esperimento di esempio fornito con questa guida introduttiva è mostrato qui di seguito.



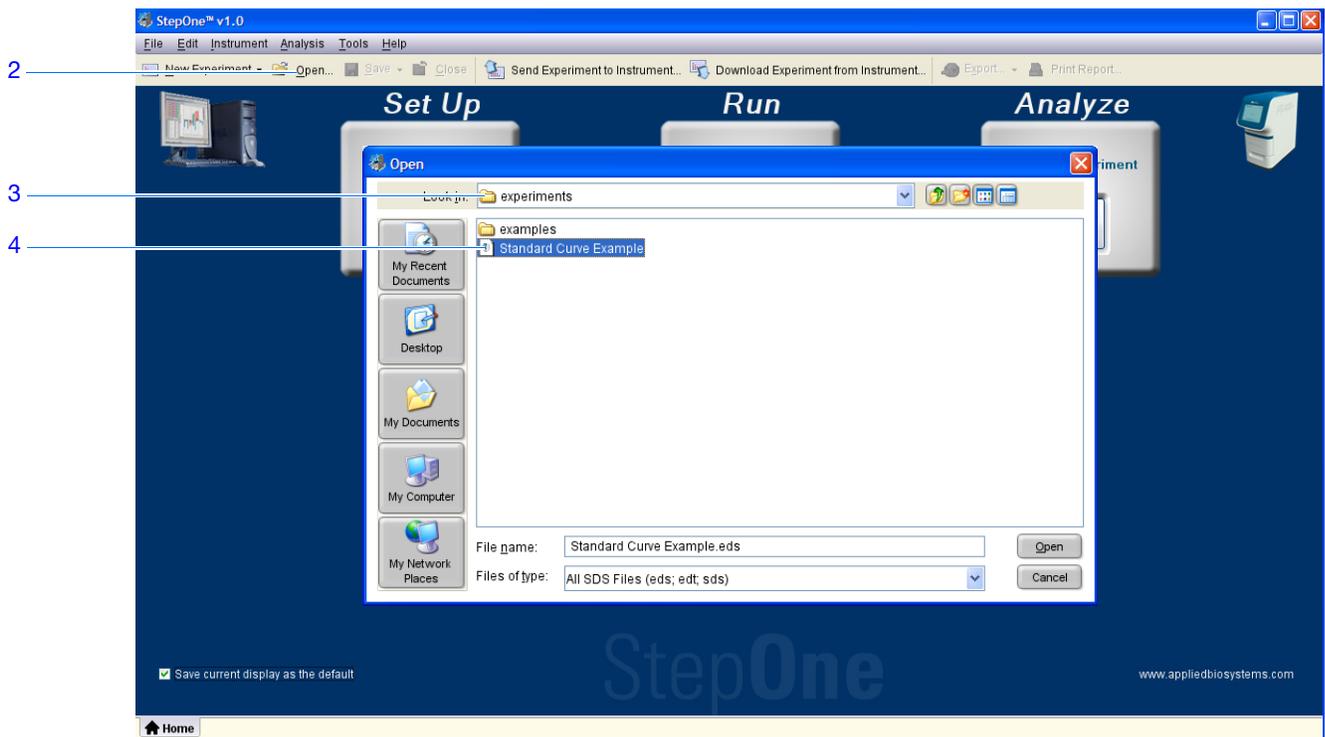
Note

Preparazione per l'esecuzione

Prepararsi all'esecuzione aprendo l'esperimento e caricando la MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate a chiusura ermetica nello strumento StepOne™.

Apertura dell'esperimento di esempio

1. Se il software StepOne™ non è ancora in esecuzione, fare doppio clic su  (collegamento del software StepOne) oppure selezionare **Start (Avvio) ▶ All Programs (Tutti i programmi) ▶ Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0**.
2. Nella schermata Home, fare clic su **Open (Apri)**.
3. Nella finestra di dialogo Open (Apri), individuare la cartella **esperimenti** (predefinita).
4. Fare doppio clic su **Standard Curve Example (Esempio curva standard)** per aprire il file dell'esperimento di esempio creato precedentemente nel [Capitolo 2](#).



Note

Caricamento della piastra di reazione



PERICOLO DI INFORTUNIO. Durante il funzionamento dello strumento, la temperatura del blocco campione può superare i 100 °C. Se lo strumento è stato utilizzato di recente, tenere le mani lontane fino a quando il blocco campione non raggiunge la temperatura ambiente.



IMPORTANTE! Indossare guanti privi di polvere per manipolare la piastra di reazione.

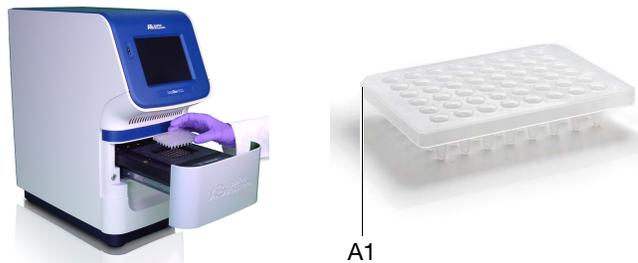
1. Aprire il cassetto dello strumento.



2. Posizionare le reazioni nel blocco campione.

L'orientamento della piastra di reazione dipende dal tipo dei materiali di consumo utilizzati:

- In caso di utilizzo di una piastra di reazione, posizionare il blocco campione con il pozzetto A1 nell'angolo posteriore sinistro.
- In caso di utilizzo di strisce con provette di reazione, posizionare le strisce nel blocco campione.



3. Chiudere con attenzione il cassetto dello strumento.



Note

(Opzionale) Abilitazione delle notifiche

Abilitare le impostazioni delle notifiche in modo tale che il software StepOne invii un avviso tramite e-mail quando lo strumento StepOne inizia l'esecuzione e quando questa viene completata, oppure nel caso si verifichi un errore durante l'esecuzione. L'abilitazione della funzione delle impostazioni delle notifiche è opzionale e non influenza le prestazioni del sistema StepOne™ o la durata dell'esecuzione.

IMPORTANTE! La funzione delle impostazioni di notifica è disponibile solo se il computer utilizzato lavora con lo strumento StepOne *ed* è collegato a una rete Ethernet.

Nota: Il sistema di notifica è disponibile anche per computer che eseguono il monitoraggio dello strumento StepOne da remoto. Per ulteriori informazioni sul monitoraggio remoto, vedere [“Monitoraggio remoto” a pagina 67](#).

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio, il software StepOne è impostato per inviare notifiche a tre utenti (ricercatore, supervisore e tecnico presso nomeazienda.com) quando il sistema StepOne termina l'esecuzione e nel caso in cui si verifichino errori durante il funzionamento. Il server SMTP dell'esempio (www.nomeazienda.com) è impostato per la criptazione Secure Sockets Layers (SSL) e richiede l'autenticazione per l'uso.

Definizione delle impostazioni di notifica

1. Nel software StepOne, fare clic su  **Run (Esegui)** nella colonna di navigazione.
2. Fare clic su  **Notification Settings (Impostazioni di notifica)**.
3. Selezionare **Enable Notifications (Abilita notifiche)**.
4. Selezionare gli eventi che attiveranno le notifiche:
 - a. Selezionare **Instrument Error (Errore dello strumento)**.
 - b. Selezionare **Run Completed (Esecuzione completata)**.
5. Nel campo Enter e-mail addresses for notification (Immetti indirizzi e-mail per le notifiche), immettere: **ricercatore@nomeazienda.com**, **supervisore@nomeazienda.com**, **tecnico@nomeazienda.com**.
6. Nel campo Outgoing Mail Server (Server posta in uscita) (SMTP), immettere **smtp.nomeazienda.com**.
7. Specificare le impostazioni di autenticazione:
 - a. Selezionare **No** per il parametro Server requires authentication (Autenticazione del server necessaria).
 - b. Nel campo User Name (Nome utente), immettere **supervisore**.
 - c. Nel campo Password, immettere **password**.

Note

Istruzioni per l'esecuzione

Quando il sistema StepOne viene impostato per la notifica automatica:

- È necessario che il sistema StepOne sia impostato per l'utilizzo in rete. Vedere la Guida all'installazione del sistema *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.
- Determinare gli eventi di cui si desidera ricevere notifica tra:
 - **Instrument Error (Errore dello strumento)** – Induce il sistema StepOne a notificare tramite e-mail ai destinatari tutti gli errori occorsi allo strumento StepOne durante ogni esecuzione.
 - **Run Started (Esecuzione avviata)** – Induce il sistema StepOne a notificare tramite e-mail ai destinatari tutte le volte che lo strumento avvia una esecuzione.
 - **Run Completed (Esecuzione completata)** – Induce il sistema StepOne a notificare tramite e-mail ai destinatari tutte le volte che lo strumento completa una esecuzione.
- Acquisire gli indirizzi e-mail per la ricezione delle notifiche

IMPORTANTE! Separare gli indirizzi con una virgola (,).

- Contattare l'amministratore dei sistemi oppure il reparto di Information Technology per
 - l'indirizzo di rete di un server simple mail transfer protocol (SMTP) sulla LAN
 - un nome utente e una password per il server, qualora siano richiesti per l'accesso
 - l'impostazione Secure Sockets Layer (SSL) del server (on oppure off)

Note

Avvio dell'esecuzione

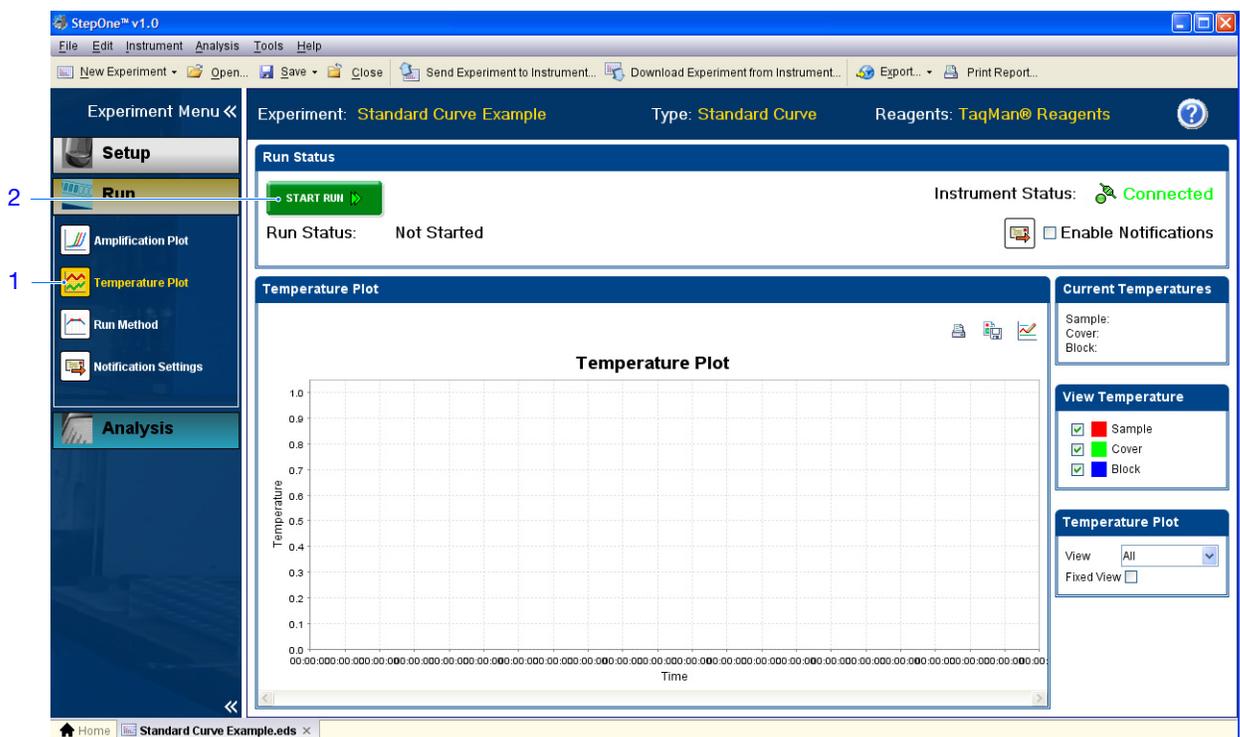
Avviare l'esecuzione in base alla configurazione dello strumento StepOne. La modalità di avvio dell'esecuzione dipende dalla configurazione del sistema StepOne:

Configurazione	Descrizione	Vedere...
Co-locata	Il cavo giallo del sistema StepOne collega il computer allo strumento StepOne	“Esecuzione dell'avvio co-locato” qui di seguito
Indipendente	<ul style="list-style-type: none"> Il computer e lo strumento StepOne non sono collegati, oppure Il computer e lo strumento StepOne sono collegati alla stessa rete. 	“Esecuzioni dell'avvio indipendente” a pagina 60

Esecuzione dell'avvio co-locato

Eseguire la procedura seguente se il computer è collegato direttamente allo strumento StepOne attraverso il cavo del sistema StepOne.

1. Nel software StepOne, fare clic su  **Temperature Plot (Plot temperatura)**.
2. Fare clic su **START RUN (AVVIA ESECUZIONE)** .



Note

Esecuzioni dell'avvio indipendente

Eeguire la procedura seguente se il computer e lo strumento StepOne *non sono* collegati direttamente attraverso il cavo giallo del sistema StepOne.

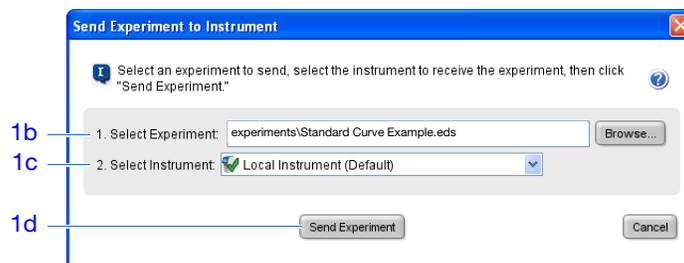
1. Se il computer e lo strumento StepOne sono collegati alla stessa rete, eseguire i [passaggi 1a a 1f](#). In caso contrario, andare al [passaggio 2](#).
 - a. Nel software StepOne, fare clic su  **Send Experiment to Instrument (Invia esperimento allo strumento)**.

- b. Nella finestra di dialogo Send Experiment to Instrument (Invia esperimento allo strumento), fare clic su **Browse (Sfogliare)**, selezionare il file **Standard Curve Example.eds**, quindi fare clic su **Open (Apri)**.

- c. Selezionare lo strumento StepOne nel menu a discesa Select Instrument (Seleziona strumento).

Nel caso in cui lo strumento StepOne non sia elencato, impostare lo strumento per il monitoraggio come spiegato nella Guida all'installazione del sistema *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

- d. Fare clic su **Send Experiment (Invia esperimento)** per inviare l'esperimento allo strumento StepOne attraverso la rete.



- e. Quando segnalato, fare clic su **OK** per chiudere la verifica.

- f. Andare al [passaggio 6](#).

2. Se lo strumento StepOne non è collegato al computer, eseguire i [passaggi 2a a 2d](#) per utilizzare una unità USB per il trasferimento dell'esperimento.

- a. Collegare l'unità USB a una delle porte USB del computer.

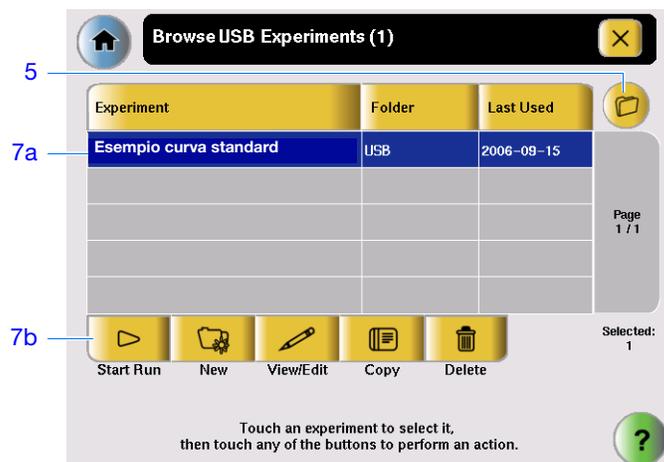
- b. Nel software StepOne, selezionare  **Save (Salva) ▶ Save As (Salva con nome)**.

- c. Nella finestra di dialogo Save (Salva), individuare l'unità USB, quindi fare clic su **Save (Salva)**.

- d. Rimuovere l'unità USB dal computer, quindi collegarla alla porta USB dello strumento StepOne.

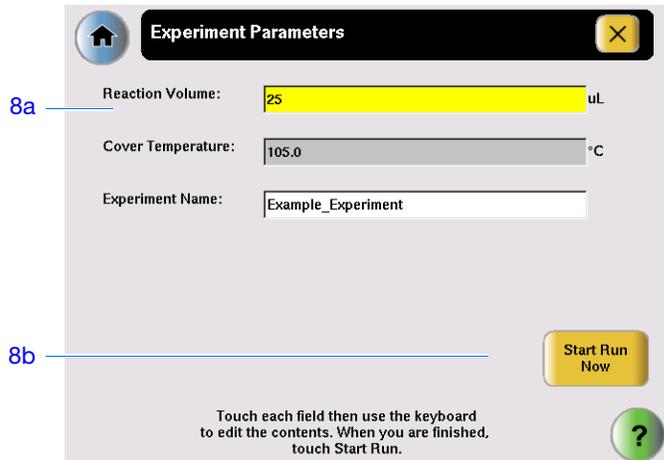


3. Sfiare il touchscreen dello strumento StepOne, quindi sfiorare .
4. Nel Main Menu (Menu principale), sfiorare **Browse Experiments (Sfogliare esperimenti)**.
5. Nella schermata Browse Methods (Metodi per sfogliare), sfiorare  (Cartelle).
6. Nella schermata Choose an Experiment Category (Scegli una categoria di esperimento):
 - Sfiare **USB** se il trasferimento dell'esperimento è stato eseguito attraverso una unità USB.
 - Sfiare **Default (Predefinito)** se l'invio dell'esperimento è stato eseguito attraverso il collegamento a una rete.
7. Nella schermata Browse USB/Default Experiments (Sfogliare esperimenti USB/predefiniti):
 - a. Sfiare **Standard Curve Example (Esempio curva standard)** per selezionare l'esperimento.
 - b. Sfiare  **Start Run (Avvia esecuzione)**.



Note

8. Nella schermata Run Parameters (Esegui parametri):
- Sfiorare il campo **Reaction Volume (Volume reazione)**, utilizzare il tastierino per immettere **25 μ l**, quindi sfiorare **Done (Fatto)**.
 - Sfiorare **Start Run (Avvia esecuzione)**.



Monitoraggio dell'esecuzione

Monitorare lo sviluppo dell'esecuzione da un computer su cui è attivo il software StepOne oppure dal touchscreen dello strumento StepOne. La modalità di monitoraggio dell'esecuzione dipende dalla configurazione del sistema StepOne:

Configurazione	Descrizione	Vedere...
Co-locata	Il cavo del sistema StepOne collega il computer e lo strumento StepOne.	“Monitoraggio co-locato” qui di seguito
Indipendente (collegato in rete)	Il computer e lo strumento StepOne sono collegati alla stessa rete.	“Monitoraggio remoto” a pagina 67
Indipendente (di base)	Il computer e lo strumento StepOne non sono collegati.	“Monitoraggio indipendente” a pagina 69

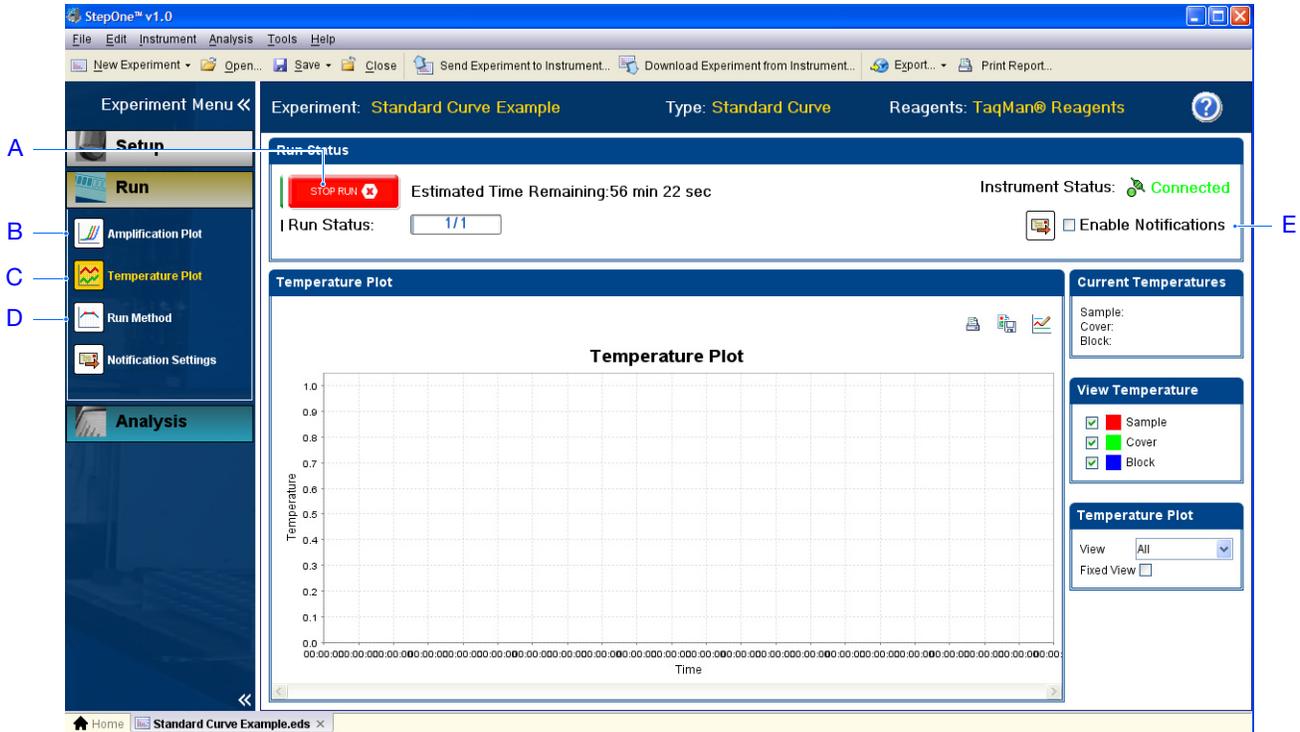
Note _____

Monitoraggio co-locato

Se il computer è collegato direttamente allo strumento StepOne attraverso il cavo del sistema StepOne, è possibile visualizzare lo sviluppo dell'esecuzione in tempo reale come descritto qui di seguito. Durante l'esecuzione, visualizzare periodicamente tutti i tre plot disponibili nel software StepOne per potenziali problemi.

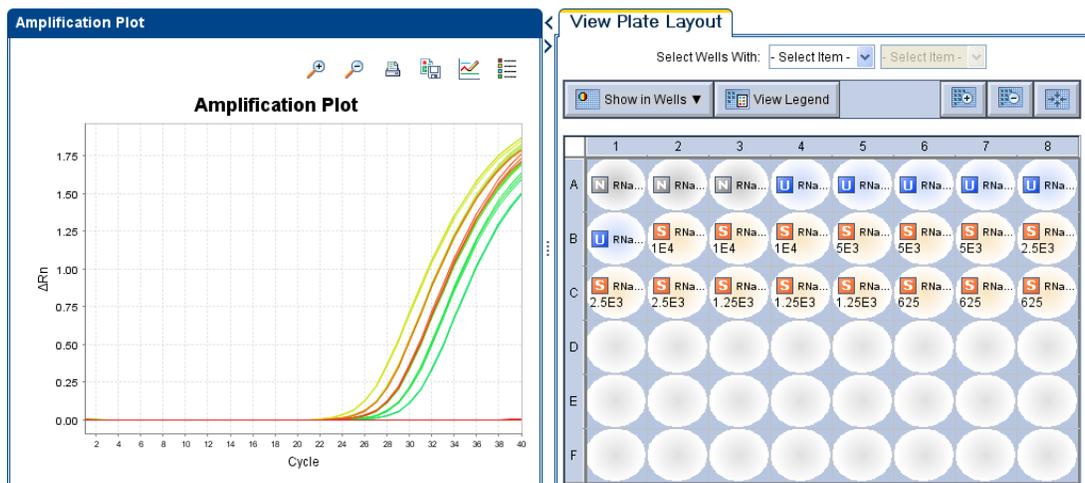
#	Per...	Azione
A	Arrestare l'esecuzione	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nel software StepOne, fare clic su STOP RUN (ARRESTA ESECUZIONE). 2. Nella casella di dialogo Stop Run (Arresta esecuzione), fare clic su una delle seguenti opzioni: <ul style="list-style-type: none"> – Stop Immediately (Arresta immediatamente) per arrestare l'esecuzione immediatamente. – Stop after Current Cycle/Hold (Arresta dopo il ciclo corrente/Attendi) per arrestare l'esecuzione dopo il ciclo corrente oppure attendere. – Cancel (Annulla) per continuare l'esecuzione.
B	Visualizzare i dati di amplificazione in tempo reale	Selezionare  Amplification Plot (Plot di amplificazione) . Vedere la sezione “ Informazioni sulla schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) ” a pagina 64.
C	Visualizzare i dati della temperatura per l'esecuzione in tempo reale	Selezionare  Temperature Plot (Plot temperatura) . Vedere la sezione “ Informazioni sulla schermata Temperature Plot (Plot temperatura) ” a pagina 65.
D	Visualizzare lo sviluppo dell'esecuzione nella schermata Run Method (Metodo di esecuzione)	Selezionare  Run Method (Metodo di esecuzione) . Vedere la sezione “ Informazioni sulla schermata Run Method (Metodo di esecuzione) ” a pagina 66.
E	Abilitare/disabilitare le impostazioni di notifica.	Selezionare o deselezionare Enable Notifications (Abilita notifiche) .

Note



Informazioni sulla schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione)

La schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) consente di visualizzare l'amplificazione del campione in seguito all'acquisizione da parte dello strumento StepOne dei dati di fluorescenza durante una sessione di analisi. Qualora un metodo sia impostato per acquisire i dati in tempo reale, la schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) visualizza i dati per i pozzetti selezionati nella scheda View Plate Layout (Visualizza layout di piastra). Il plot evidenzia la fluorescenza del colorante normalizzata (ΔR_n) e il numero di ciclo. La figura qui di seguito mostra la schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) come appare durante l'esperimento di esempio.



Note

La schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) è utile per l'identificazione e l'esame dell'amplificazione anomala. L'amplificazione anomala può includere:

- Fluorescenza aumentata nei pozzetti di controllo negativi.
- Assenza di fluorescenza rilevabile per un determinato ciclo (dovuta all'utilizzo degli stessi reagenti sotto le stesse condizioni in esperimenti precedenti simili).

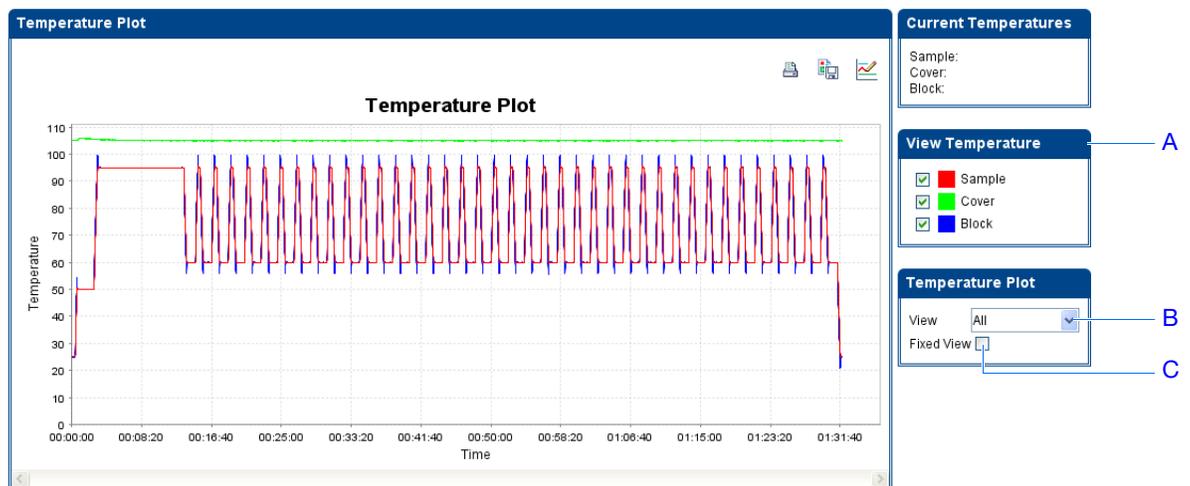
Nel caso si noti amplificazione anomala o una completa assenza di segnale, risolvere il problema come spiegato nella Guida del software StepOne (fare clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionare **Help [Guida] ▶ StepOne [Guida StepOne]**).

Nota: Per visualizzare i dati nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), selezionare i pozzetti da visualizzare nella scheda View Plate Layout (Visualizza layout di piastra).

Informazioni sulla schermata Temperature Plot (Plot temperatura)

Durante una sessione di analisi, la schermata Temperature Plot (Plot temperatura) visualizza le temperature del blocco campione, del pannello di copertura riscaldato e dei campioni (calcolate) in tempo reale. La figura qui di seguito mostra la schermata Temperature Plot (Plot temperatura) come appare durante l'esperimento di esempio.

	Per...	Azione
A	Aggiungere/Rimuovere i plot della temperatura	Selezionare Sample (Campione) , Heated Cover (Pannello di copertura riscaldato) oppure Sample Block (Blocco campione) per alternare la presenza dei dati associati nel plot.
B	Modificare il tempo visualizzato dal plot	Selezionare View (Visualizza) ▶ (durata temporale).
C	Restringere l'asse Y del plot	Selezionare Fixed View (Visualizzazione fissa) .



Note

La schermata Temperature Plot (Plot temperatura) è spesso utile per l'identificazione di guasti hardware. Durante il monitoraggio della schermata Temperature Plot (Plot temperatura), osservare il campione, il pannello di copertura riscaldato e il blocco campione per rilevare eventuali comportamenti anomali.

- In generale, i plot del campione e quello del blocco si rispecchiano approssimativamente l'uno con l'altro. Una deviazione significativa dei plot potrebbe indicare un problema.
- Il pannello di copertura riscaldato deve mantenere costantemente la temperatura specificata nel metodo. Uno scostamento da tale temperatura uniforme potrebbe indicare un problema.

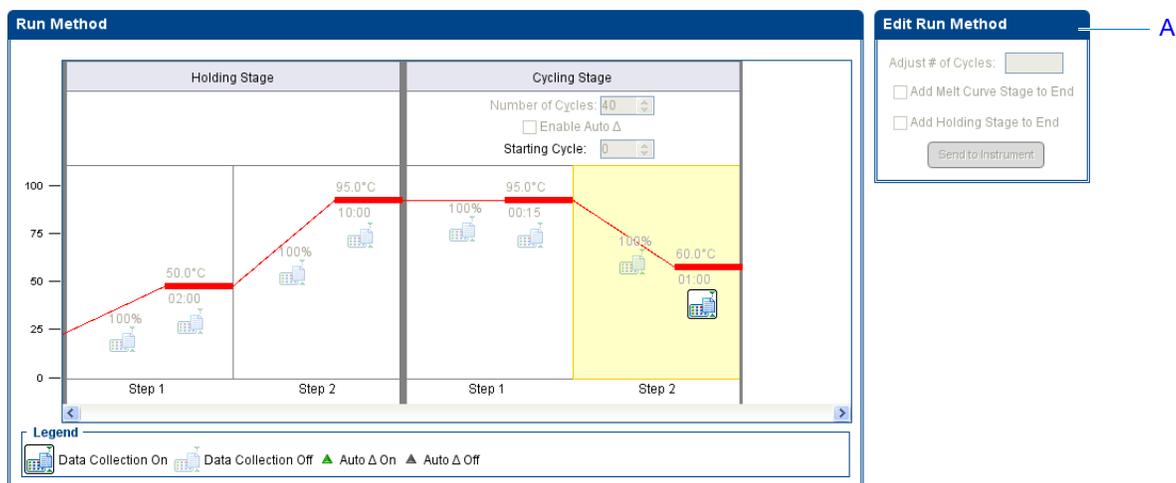
Nel caso si noti un plot di temperatura anomalo, risolvere il problema come spiegato nella Guida del software StepOne (fare clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionare **Help [Guida] ▶ StepOne Help [Guida StepOne]**).

Nota: La temperatura del campione visualizzata nel gruppo Current Temperatures (Temperature correnti) corrisponde a un valore di stima.

Informazioni sulla schermata Run Method (Metodo di esecuzione)

Dopo l'avvio dell'esecuzione, il sistema StepOne visualizza lo sviluppo dell'esecuzione nella schermata Run Method (Metodo di esecuzione). La visualizzazione riporta lo sviluppo dell'esecuzione in riferimento al profilo termico del metodo. La figura qui di seguito mostra la schermata Run Method (Metodo di esecuzione) come appare nell'esperimento di esempio.

	Per...	Azione
A	Modificare il metodo di esecuzione (aggiungere cicli, una fase di attesa o una curva di melting)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nel pannello di navigazione, fare clic su  Run Method (Metodo di esecuzione). 2. Nella schermata Run Method (Metodo di esecuzione), effettuare alcune delle seguenti azioni: <ul style="list-style-type: none"> – Immettere il numero di cicli da applicare alla fase ciclica. – Selezionare Add Melt Curve Stage to End (Aggiungi fase curva melt alla fine) nel caso si desideri aggiungere una fase di curva di melting alla fine dell'esecuzione. – Selezionare Add Holding Stage to End (Aggiungi fase di attesa alla fine) nel caso si desideri aggiungere una fase di attesa alla fine dell'esecuzione. 3. Fare clic su Send to Instrument (Invia allo strumento).



Nota: Nel caso compaia un avviso, fare clic sull'errore per ulteriori informazioni e per risolvere il problema come spiegato nella Guida del software StepOne software (fare clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionare **Help [Guida] ▶ StepOne Help [Guida StepOne]**).

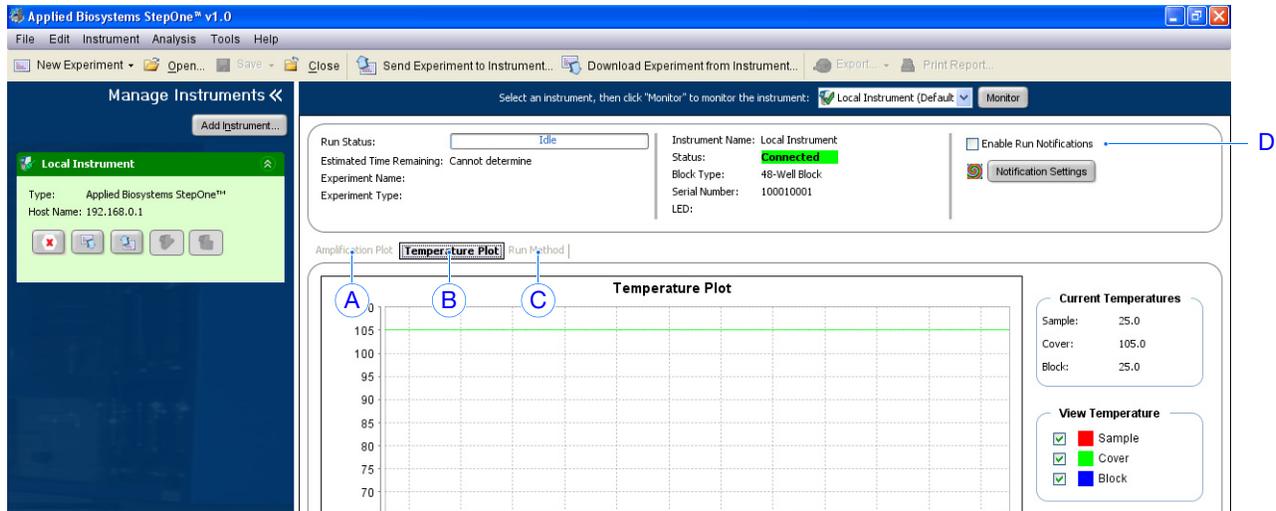
Monitoraggio remoto

Se lo strumento StepOne è collegato a una rete, è possibile utilizzare la funzione di monitoraggio remoto del software StepOne per visualizzare lo sviluppo dell'esecuzione in tempo reale da qualunque computer in rete.

IMPORTANTE! I computer in rete non sono abilitati a controllare lo strumento StepOne ma solo a monitorarlo.

#	Per...	Azione
A	Visualizzare i dati di amplificazione in tempo reale	Fare clic su Amplification Plot (Plot di amplificazione) . Vedere la sezione “ Informazioni sulla schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) ” a pagina 64.
B	Visualizzare i dati della temperatura per l'esecuzione in tempo reale	Fare clic su Temperature Plot (Plot temperatura) . Vedere la sezione “ Informazioni sulla schermata Temperature Plot (Plot temperatura) ” a pagina 65.
C	Visualizzare lo sviluppo dell'esecuzione nella schermata Run Method (Metodo di esecuzione)	Fare clic su Run Method (Metodo di esecuzione) . Vedere la sezione “ Informazioni sulla schermata Run Method (Metodo di esecuzione) ” a pagina 66.
D	Abilitare/disabilitare le impostazioni di notifica.	Selezionare o deselezionare Enable Notifications (Abilita notifiche) . Vedere la sezione “ (Opzionale) Abilitazione delle notifiche ” a pagina 57.

Note

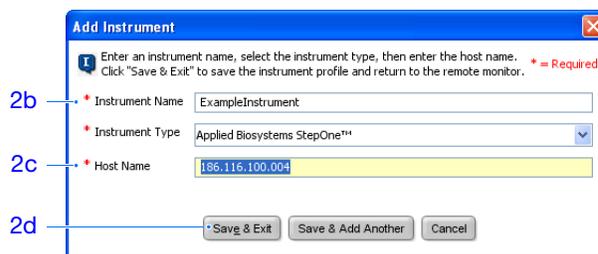


Per monitorare lo strumento StepOne da remoto:

1. Nel software StepOne, selezionare **Instrument (Strumento) ▶ Remote Monitor (Monitoraggio remoto)**.
2. Nella barra di navigazione, selezionare lo strumento StepOne.

Se lo strumento StepOne non è elencato nella barra di navigazione:

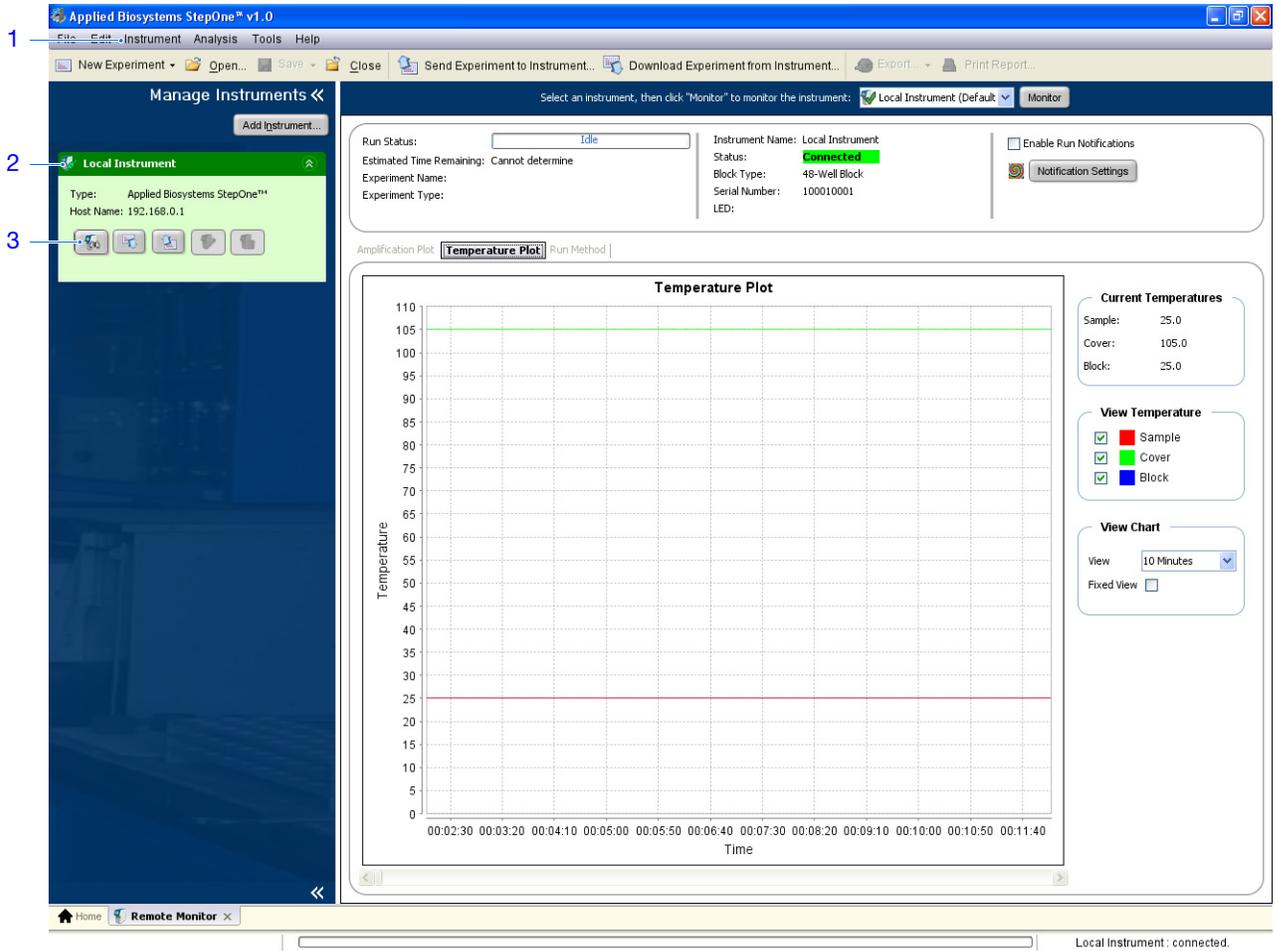
- a. Fare clic su **Add Instrument (Aggiungi strumento)**.
- b. Fare clic sul campo **Instrument Name (Nome strumento)**, quindi immettere il nome dello strumento.
- c. Fare clic sul campo **Host Name (Nome host)**, quindi immettere l'indirizzo IP dello strumento.
- d. Fare clic su **Save & Exit (Salva ed Esci)**.



Nota: Per ulteriori informazioni sulla configurazione dello strumento StepOne per l'utilizzo in rete o per il monitoraggio remoto, vedere la Guida all'installazione del sistema *Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System*.

3. Fare clic su  (Start monitoring this instrument (Avvia monitoraggio di questo strumento)) per lo strumento stesso.

Note



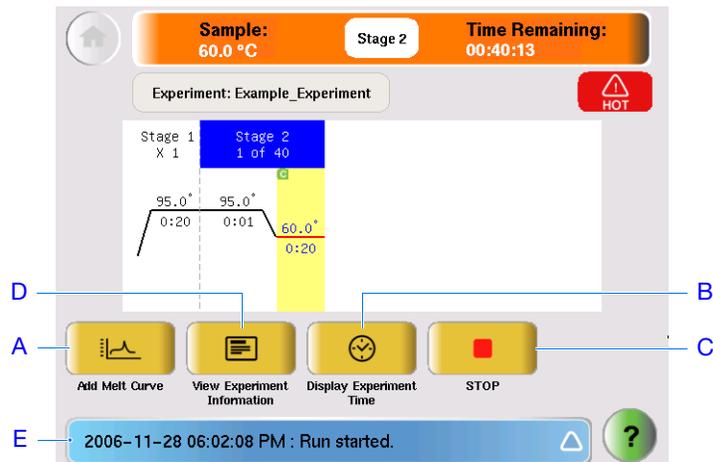
Monitoraggio indipendente

Nel caso sia stata avviata l'esecuzione dallo strumento StepOne, è possibile visualizzare lo sviluppo dell'esecuzione dal touchscreen. La schermata Run Method (Metodo di esecuzione) visualizza il metodo per l'esperimento ed evidenzia le fasi del profilo termico nel modo in cui lo strumento le esegue.

#	Per...	Azione
A	Aggiungere una fase di dissociazione all'esecuzione	Sfiorare (Add Dissociation Curve - Aggiungi curva di dissociazione), quindi sfiorare OK .
B	Visualizzare il tempo residuo dell'esecuzione	Sfiorare Display Method Time (Visualizza tempo metodo) , quindi sfiorare per ritornare alla schermata Run Method (Metodo di esecuzione).
C	Arrestare l'esecuzione	Sfiorare Stop (Arresta) , quindi sfiorare: <ul style="list-style-type: none"> Stop (Arresta) per arrestare l'esecuzione dopo il completamento da parte dello strumento del ciclo corrente o per metterla in fase di attesa. Abort (Interrompi) per arrestare l'esecuzione immediatamente. per continuare l'esecuzione senza alcuna modifica.

Note

#	Per...	Azione
D	Visualizzare le informazioni dell'esperimento	Sfiorare  View Method Information (Visualizza informazioni metodo) , quindi sfiorare  per ritornare alla schermata Run Method (Metodo di esecuzione).
E	Visualizzare il log di errore	Sfiorare la barra di stato per visualizzare il log di errore.



Note _____

Download della piastra di reazione e trasferimento dei dati

Quando lo strumento StepOne visualizza la schermata Run History (Storico esecuzione), scaricare la piastra di reazione dallo strumento StepOne e trasferire i dati dell'esperimento al computer per l'analisi degli stessi.

Download della piastra di reazione

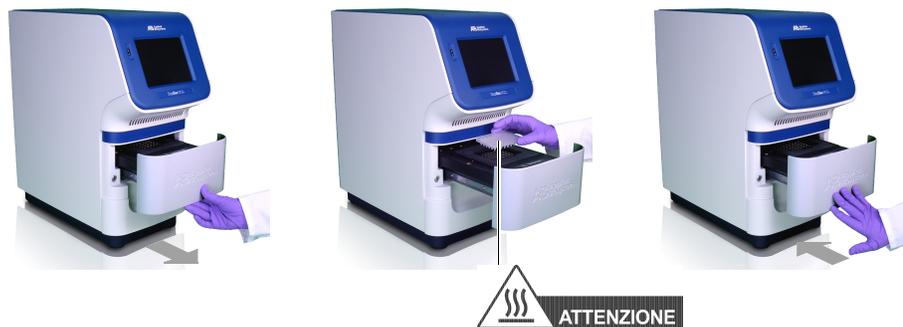


ATTENZIONE

PERICOLO DI INFORTUNIO. Durante il funzionamento dello strumento, la temperatura del blocco campione può superare i 100 °C. Tenere le mani a distanza fino a quando il blocco campione non raggiunge la temperatura ambiente.

Nota: Quando lo strumento StepOne completa una sessione di analisi, il sistema salva i dettagli dell'esecuzione nello storico dell'esecuzione, che resta nel sistema fino al completamento di un'altra sessione.

1. Quando appare la schermata Run Report (Rapporto esecuzione) sul touchscreen dello strumento StepOne, sfiorare .
2. Aprire il cassetto dello strumento.
3. Rimuovere la piastra di reazione dal blocco campione.
4. Chiudere il cassetto dello strumento con attenzione.



IMPORTANTE! Non spegnere lo strumento StepOne dopo una sessione. Lo strumento entra automaticamente in una modalità di ibernazione quando non è in uso.

Note

Selezione di un metodo di trasferimento dei dati

Trasferire l'esperimento al computer per l'analisi secondo la disposizione del sistema StepOne:

Configurazione	Descrizione	Vedere...
Co-locata	Il cavo del sistema StepOne collega il computer e lo strumento StepOne.	"Trasferimento dati co-locato" qui di seguito
Indipendente (collegato in rete)	Il computer e lo strumento StepOne sono collegati alla stessa rete.	"Trasferimento dati da remoto" a pagina 72
Indipendente (di base)	Il computer e lo strumento StepOne non sono collegati.	"Trasferimento dati indipendente" a pagina 73

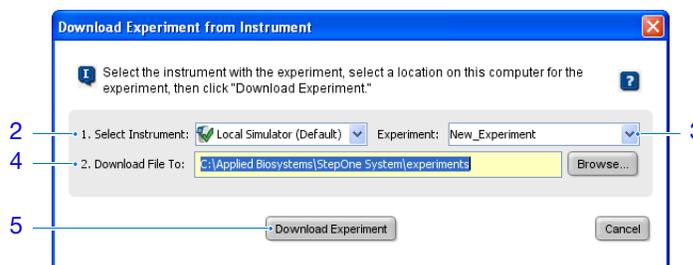
Trasferimento dati co-locato

Se il computer è collegato direttamente allo strumento StepOne attraverso il cavo del sistema StepOne, non è necessaria alcuna azione. Il software StepOne trasferisce automaticamente i dati dell'esperimento allo strumento StepOne dopo l'esecuzione.

Trasferimento dati da remoto

Se il computer e lo strumento sono collegati alla stessa rete Ethernet, inviare l'esperimento allo strumento StepOne attraverso la rete:

1. Nel software StepOne, fare clic su  **Download Experiment from Instrument (Scarica l'esperimento dallo strumento)**.
2. Nella finestra di dialogo Download Experiment from Instrument (Scarica l'esperimento dallo strumento), selezionare **Select Instrument (Seleziona strumento)** ▶ *<NomeStrumento>*.
3. Selezionare **Experiment (Esperimento)** ▶ **Standard Curve Example (Esempio curva standard)**.
4. Nel campo Download File To (Scarica file su), fare clic su **Browse (Sfoggia)**, selezionare una cartella per ricevere i dati dell'esperimento, quindi fare clic su **Select (Seleziona)**.
5. Fare clic su **Download Experiment (Scarica esperimento)** per scaricare l'esperimento dallo strumento StepOne al computer attraverso la rete.



6. Quando segnalato, fare clic su **OK** per chiudere la verifica.

Note



Trasferimento dati indipendente

Se il computer non è collegato allo strumento StepOne, utilizzare l'unità USB per trasferire l'esperimento allo strumento StepOne:

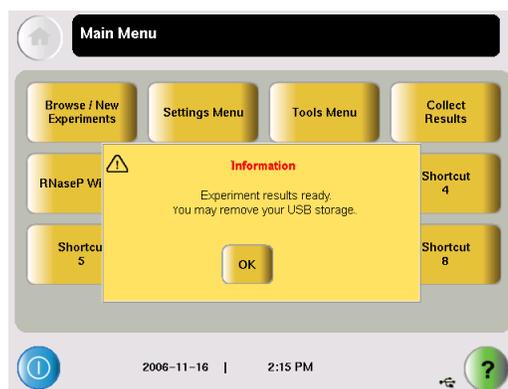
1. Qualora non sia già stato fatto, collegare una unità USB alla porta USB.



2. Sfiore il touchscreen dello strumento StepOne per attivarlo, quindi sfiorare .
3. Nel Main Menu (Menu principale), sfiorare **Collect Results (Acquisisci risultati)** per salvare i dati in una unità USB.

Qualora lo strumento StepOne non riconosca l'unità USB, sfiorare **OK**, attendere 30 sec, quindi sfiorare nuovamente **Collect Results (Acquisisci risultati)**.

4. Una volta eseguito il trasferimento dei dati, sfiorare **OK**.



5. Rimuovere l'unità USB dallo strumento StepOne, quindi collegarla alla porta USB del computer.
6. Nel desktop del computer, utilizzare Esplora risorse di Windows per aprire l'unità USB.

Note

7. Copiare il file Standard Curve Example.eds in:

<unità>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments

dove <unità> indica il disco rigido del computer sul quale è installato il software StepOne. L'unità di installazione predefinita per il software è l'unità C.

5

Analisi dell'esperimento

Questo capitolo comprende i paragrafi:

- Descrizione generale 76
- Sezione 5.1 Verifica dei risultati 77
- Sezione 5.2 Risoluzione problemi (se necessario) 97

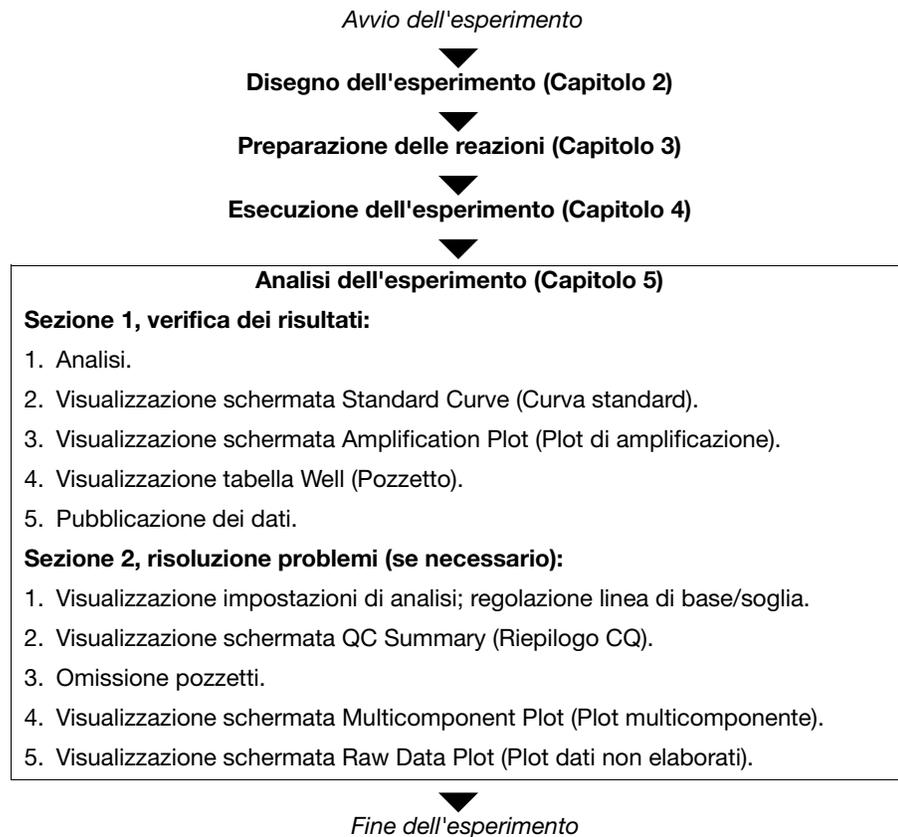
Nota: Per ulteriori informazioni sugli argomenti trattati in questa guida, accedere alla voce Help (Guida) nel software del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System premendo **F1**, facendo clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionando **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

Descrizione generale

Il software StepOne™ analizza i dati utilizzando il metodo di quantificazione con curva standard. La sezione 1 di questo capitolo spiega come rivedere i dati analizzati utilizzando molte delle schermate di analisi e come pubblicare i dati. Nel caso si ottengano risultati discutibili, la sezione 2 di questo capitolo spiega come risolvere i relativi problemi in alcuni passaggi.

Flusso di lavoro dell'esperimento di esempio

Il flusso di lavoro per l'analisi dell'esperimento di esempio fornito con questa guida introduttiva è mostrato qui di seguito.



Sezione 5.1 Verifica dei risultati

Questa sezione comprende i paragrafi:

■ Analisi dell'esperimento	78
■ Visualizzazione della curva standard	84
■ Visualizzazione del plot di amplificazione	87
■ Visualizzazione della tabella dei pozzetti	92
■ Pubblicazione dei dati	95

Note

Analisi dell'esperimento

Il software StepOne analizza l'esperimento e visualizza i risultati nella schermata di analisi (ad esempio, la schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), la schermata QC Summary (Riepilogo CQ) e così via).

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, utilizzare il file dei dati che viene installato con il software StepOne. Il file dei dati è stato creato con gli stessi parametri di disegno forniti nel [Capitolo 2](#), quindi è stata eseguita una sessione di analisi e i dati relativi sono stati analizzati su uno strumento StepOne™.

Il file dei dati per l'esperimento di esempio si trova all'interno del computer:

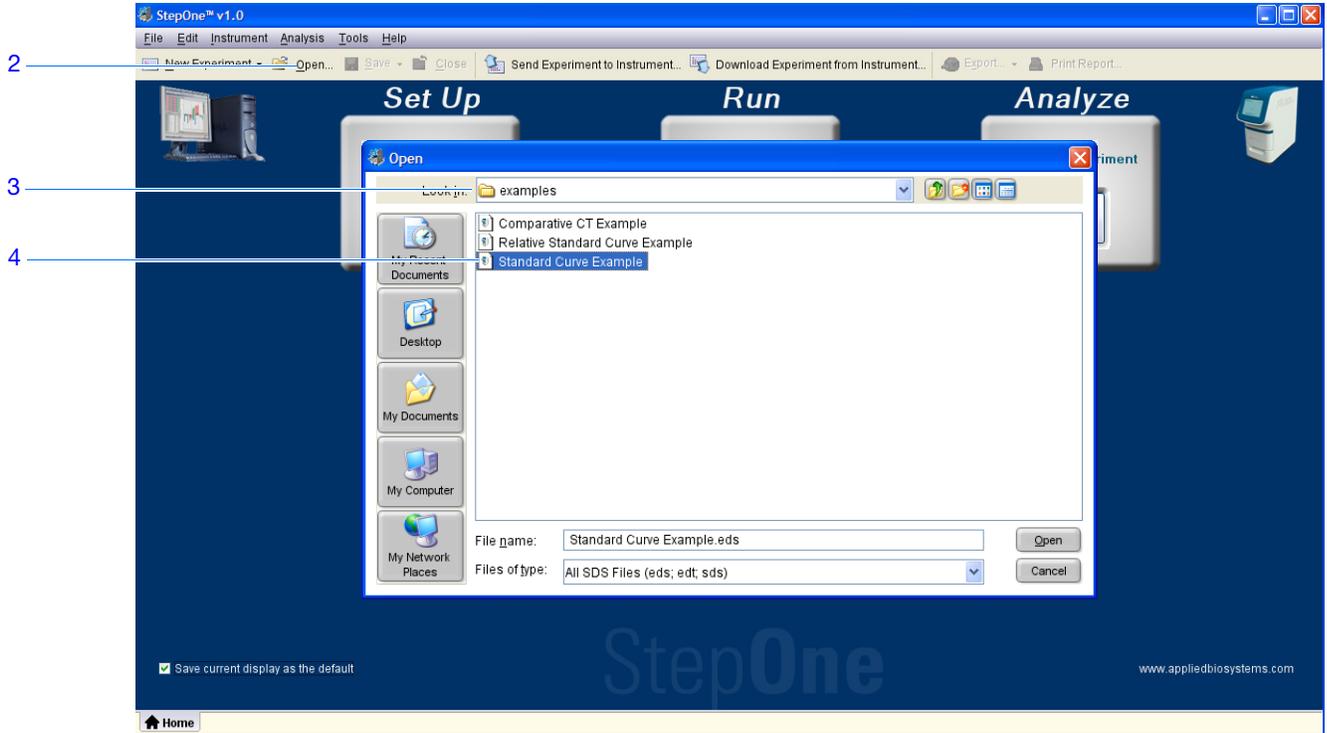
<unità>:\Applied Biosystems\StepOne System\experiments\examples

dove <unità> indica il disco rigido del computer sul quale è installato il software StepOne. L'unità di installazione predefinita per il software è l'unità C.

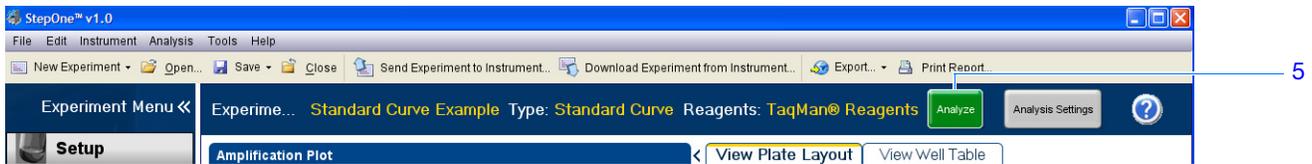
Analisi dell'esperimento di esempio

1. Se il software StepOne non è ancora in esecuzione, fare doppio clic su  (collegamento software StepOne) oppure selezionare **Start (Avvio) ▶ All Programs (Tutti i programmi) ▶ Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0**.
2. Nella schermata Home, fare clic su **Open (Apri)**.
3. Nella finestra di dialogo Open (Apri), individuare la cartella **esempi**.
4. Fare doppio clic su **Standard Curve Example (Esempio curva standard)** per aprire il file dei dati dell'esperimento di esempio.

Note



5. Fare clic su **Analyze (Analizza)**. Il software analizza i dati utilizzando le impostazioni di analisi predefinite.



6. Vedere “Elementi del software” qui di seguito e “Suggerimenti per la navigazione” a pagina 82 per informazioni sulla navigazione all'interno delle schermate di analisi.

Note

Linee guida Per analizzare il proprio esperimento con curva standard:

- Immediatamente dopo la sessione di analisi, il software StepOne analizza automaticamente i dati utilizzando le impostazioni di analisi predefinite, quindi visualizza la schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) sul computer.
- Per rianalizzare i dati, selezionare tutti i pozzetti nel layout di piastra, quindi fare clic su **Analyze (Analizza)**.

Elementi del software Gli elementi del software StepOne per le schermate di analisi sono illustrati qui di seguito.

1. Barra dei menu – Visualizza i menu disponibili nel software:

- File
- Edit (Modifica)
- Instrument (Strumento)
- Analysis (Analisi)
- Tools (Strumenti)
- Help (Guida)

2. Barra degli strumenti – Visualizza gli strumenti disponibili nel software:

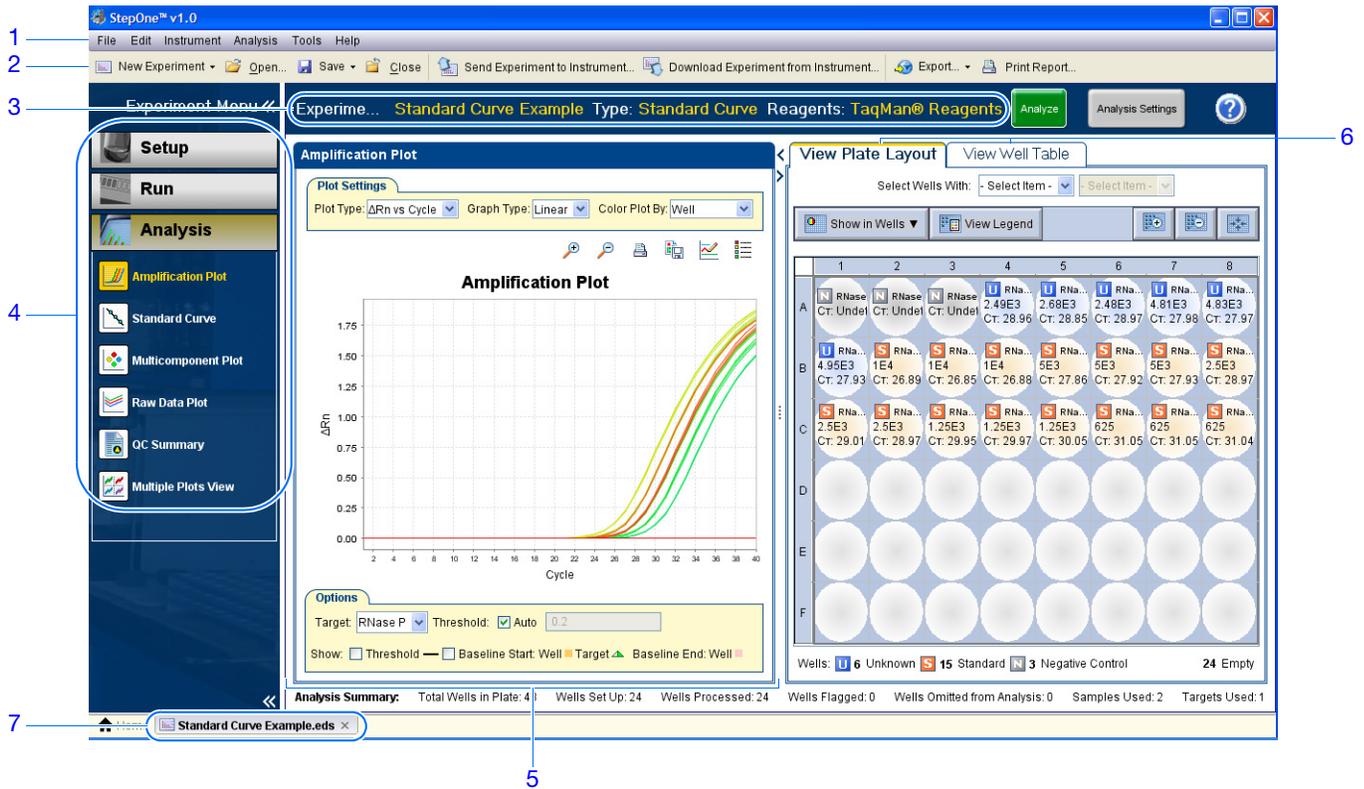
- New Experiment (Nuovo esperimento)
- Open (Apri)
- Save (Salva)
- Close (Chiudi)
- Send Experiment to Instrument (Invia esperimento allo strumento)
- Download Experiment from Instrument (Scarica esperimento dallo strumento)
- Export (Esporta)
- Print Report (Stampa rapporto)

3. Intestazione esperimento – Visualizza il nome dell'esperimento, il tipo di esperimento e i reagenti per l'apertura dell'esperimento.

4. Pannello Experiment Menu (Menu esperimento) – Fornisce collegamenti (link) alle seguenti schermate del software:

- Schermate Setup (Impostazione)
- Schermate Run (Esecuzione)
- Schermate Analysis (Analisi):
 - Amplification Plot (Plot di amplificazione)
 - Standard Curve (Curva standard)
 - Multicomponent Plot (Plot multicomponente)
 - Raw Data Plot (Plot dati non elaborati)
 - QC Summary (Riepilogo CQ)
 - Multiple Plots View (Visualizzazione plot multipli)

5. Pannello plot – Visualizza la schermata di analisi selezionata per l'esperimento aperto.
6. Schede visualizzazione – Visualizzano il layout di piastra o la tabella Well (Pozzetto) per l'esperimento aperto
7. Schede esperimento – Visualizzano una scheda per ogni esperimento aperto.



Note

Suggerimenti per la navigazione

Come selezionare i pozzetti

Per visualizzare pozzetti specifici nella schermata di analisi, selezionare i pozzetti nella scheda View Plate Layout (Visualizza layout di piastra) come segue:

1. Per selezionare uno specifico tipo di pozzetto, utilizzare i menu a discesa Select Wells With (Seleziona i pozzetti con): Selezionare **Sample (Campione)**, **Target (Target)** oppure **Task (Operazione)**, quindi selezionare il campione, il target oppure il nome dell'operazione.
2. Per selezionare un singolo pozzetto, fare clic sul pozzetto nel layout della piastra.
3. Per selezionare pozzetti multipli, fare clic e trascinare i pozzetti desiderati, premere **CTRL+clic**, oppure premere **Shift+clic** nel layout di piastra.
4. Per selezionare tutti i 48 pozzetti, fare clic sull'angolo in alto a sinistra del layout di piastra.

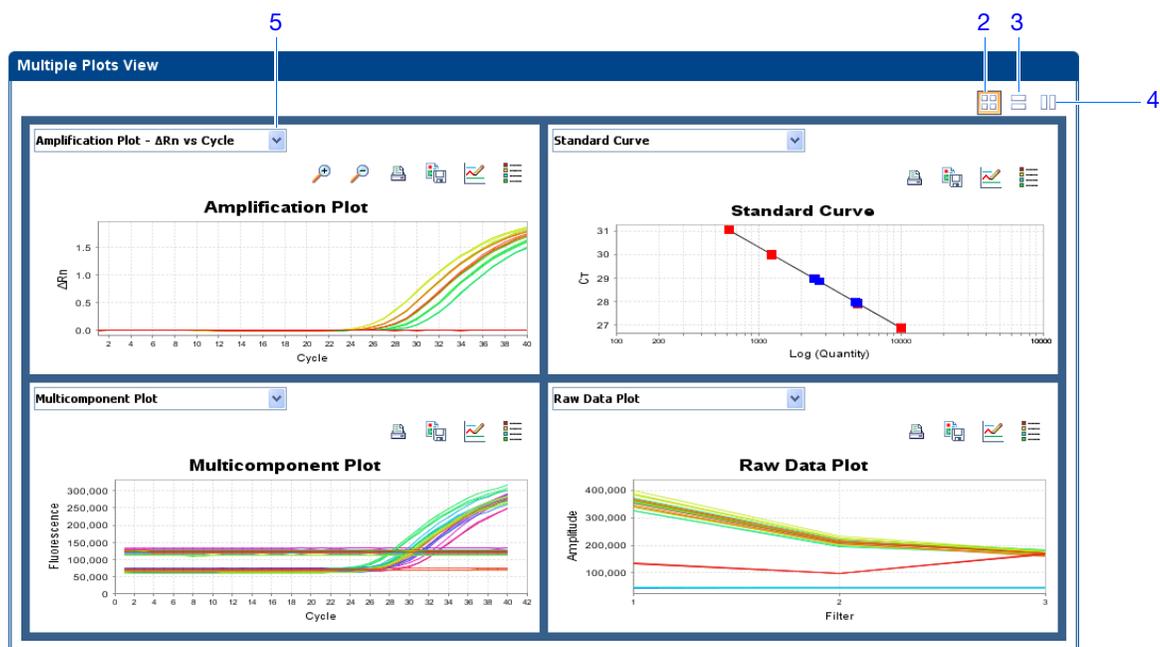
The screenshot shows the 'View Plate Layout' interface. At the top, there are two tabs: 'View Plate Layout' (active) and 'View Well Table'. Below the tabs is a 'Select Wells With' dropdown menu set to 'Sample', with a sub-menu open showing 'pop1' and 'pop2'. To the left of the grid are 'Show in Wells' and 'View Legend' buttons. The grid itself is a 6x8 matrix of wells, labeled A-F on the y-axis and 1-8 on the x-axis. Each well contains a colored icon (N, U, or S) and text indicating the sample name and Ct value. For example, well A4 contains 'RNase P' with Ct: 28.96. The bottom of the grid shows a summary: 'Wells: U 6 Unknown S 15 Standard N 3 Negative Control' and '24 Empty'.

Note

Come visualizzare plot multipli

Utilizzare la schermata Multiple Plots (Plot multipli) per visualizzare fino a quattro plot simultaneamente. Per navigare all'interno della schermata Multiple Plots (Plot multipli):

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **Multiple Plots View (Visualizzazione plot multipli)**.
2. Per visualizzare quattro plot, fare clic su  **Show plots in a 2 × 2 matrix (Visualizza plot in una matrice 2 x 2)**.
3. Per visualizzare due plot in righe, fare clic su  **Show plots in two rows (Visualizza plot in due righe)**.
4. Per visualizzare due plot in colonne, fare clic su  **Show plots in two columns (Visualizza i plot in due colonne)**.
5. Per visualizzare un plot specifico, selezionare il plot nel menu a discesa che si trova sopra ogni visualizzazione del plot.



Note

Visualizzazione della curva standard

La schermata Standard Curve (Curva standard) visualizza la curva standard per i campioni designati come standard. Il software StepOne calcola la quantità di un target non noto dalla curva standard.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, viene rivisualizzata la schermata Standard Curve (Curva standard) per i seguenti valori del coefficiente di regressione:

- Pendenza/efficienza di amplificazione
- valore R^2 (coefficiente di correlazione)
- valori C_T

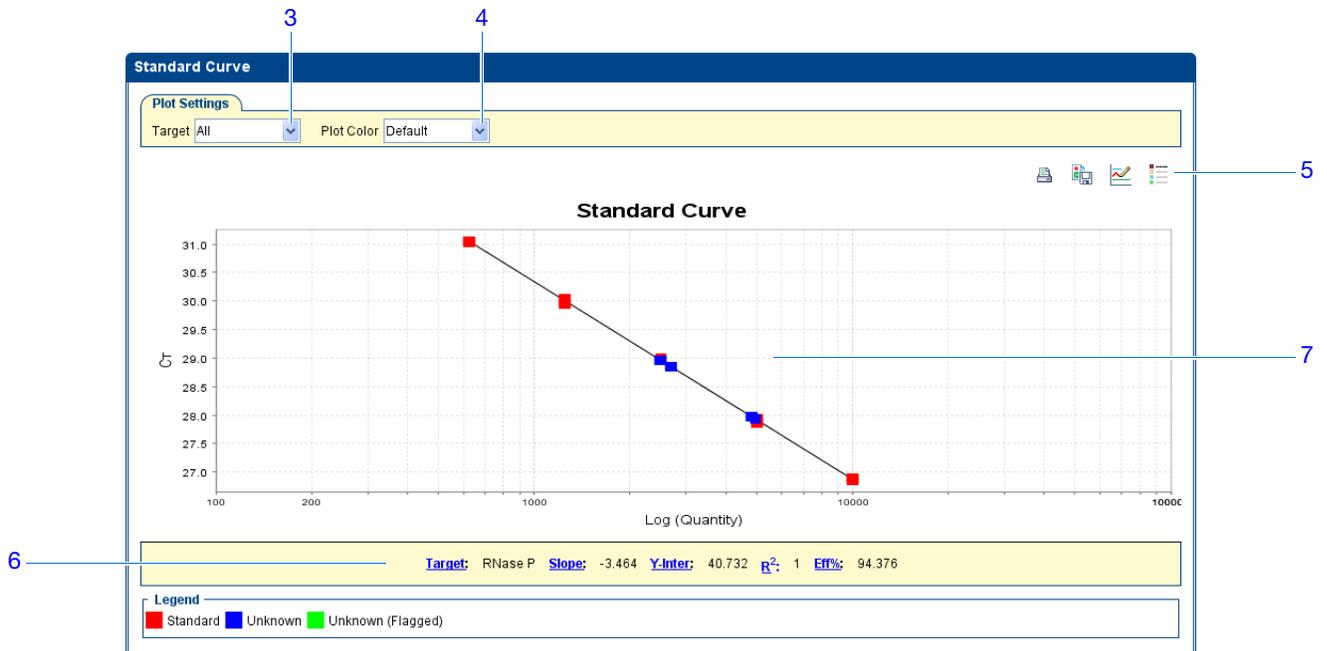
Visualizzazione della curva standard

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **Standard Curve (Curva standard)**.

Nota: Se non viene visualizzato alcun dato nella schermata Standard Curve (Curva standard), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

2. Visualizzare tutti i 48 pozzetti nella schermata Standard Curve (Curva standard) facendo clic sull'angolo in alto a sinistra del layout di piastra nella scheda View Plate Layout (Visualizza layout di piastra).
3. Nel menu a discesa Target, selezionare **All (Tutti)**.
4. Nel menu a discesa Plot Color (Colore plot), selezionare **Default (Predefinito)**.
5. Fare clic su  **Show/Hide the plot legend (Mostra/Nascondi la legenda del plot)**.
6. Visualizzare i valori indicati al di sotto della curva standard. Nell'esperimento di esempio, i valori per il target (RNase P) cadono all'interno dei range accettabili:
 - La pendenza è $-3,464$.
 - Il valore di R^2 è 1.
 - L'efficienza di amplificazione (Eff%) è 94,376%.
7. Verificare che tutti i campioni si trovino all'interno della curva standard. Nell'esperimento di esempio, tutti i campioni (punti blu) sono all'interno della curva standard (punti rossi).

Note



8. Verificare i valori C_T :

- a. Fare clic sulla scheda **View Well Table (Visualizza tabella pozzetti)**.
- b. Nel menu a discesa Group By (Raggruppa per), selezionare **Replicate (Replicati)**.
- c. Osservare i valori nella colonna C_T . Nell'esperimento di esempio, i valori C_T cadono all'interno del range atteso (>8 e <35).

View Plate Layout **View Well Table**

Select Wells With: - Select Item - - Select Item -

Show in Table Group By Expand All Collapse All

#	Well	Omit	Flag	Sample ...	Target N...	Task	Dyes	C _T	C _T Mean	C _T SD	Rn	ΔRn	Quantity
RNase P													
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...			0	0.617	0
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...			0	0.563	-0
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-...	Undetermi...			0	0.583	0.005
RNase P - 10000.0													
4	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.890259	26.874556	0.021	2.422	1.851	10,0
5	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.85095	26.874556	0.021	2.464	1.874	10,0
6	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	26.882454	26.874556	0.021	2.459	1.873	10,0
RNase P - 1250.0													
7	C3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.949043	29.989813	0.053	2.208	1.622	1,0
8	C4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.9701	29.989813	0.053	2.229	1.643	1,0
9	C5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	30.050293	29.989813	0.053	2.176	1.601	1,0
RNase P - 2500.0													
10	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.97373	28.981377	0.021	2.264	1.705	2,0
11	C1	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	29.005375	28.981377	0.021	2.338	1.71	2,0
12	C2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	28.965023	28.981377	0.021	2.28	1.698	2,0
RNase P - 5000.0													
13	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.860065	27.904566	0.039	2.413	1.834	5,0
14	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.921917	27.904566	0.039	2.391	1.818	5,0
15	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	27.931719	27.904566	0.039	2.366	1.801	5,0
RNase P - 625.0													
16	C6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-...	31.05255	31.04659	0.01	2.074	1.499	5,0

Note

Linee guida analisi

Per analizzare il proprio esperimento con curva standard, calcolare:

- **Valori di pendenza/efficienza di amplificazione** – L'efficienza di amplificazione viene calcolata utilizzando la pendenza della linea di regressione nella curva standard. Una pendenza vicina a $-3,3$ indica un'efficienza di amplificazione PCR ottimale, del 100%. Fattori che influenzano l'efficienza di amplificazione:
 - Range delle quantità degli standard – Per misurazioni dell'efficienza più accurate e precise, utilizzare un range di quantità degli standard ampio, da 5 a 6 log. (10^5 - 10^6 volte).
 - Numero di replicati degli standard – Per misurazioni dell'efficienza più accurate, includere i replicati per diminuire gli effetti delle inesattezze relative al pipettaggio.
 - Inibitori della PCR - La presenza di inibitori della PCR nella reazione può ridurre l'efficienza di amplificazione.
- **Valori^R 2 (coefficiente di correlazione)** – Il valore R^2 misura la vicinanza di accordo tra la linea di regressione e i data point del C_T individuale delle reazioni degli standard. Un valore di 1,00 indica un perfetto accordo tra la linea di regressione e i datapoint. Un valore di $R^2 >0,99$ è auspicabile.
- **Valori C_T** – Il ciclo soglia (C_T) è il numero di cicli PCR al quale il livello di fluorescenza raggiunge la soglia. Un valore di $C_T >8$ e <35 è auspicabile. Un valore di $C_T <8$ indica la presenza eccessiva di template nella reazione. Un valore di $C_T >35$ indica una scarsa quantità di target nella reazione; per valori $C_T >35$, si attende una deviazione standard maggiore.

Nel caso l'esperimento non sia conforme alle linee guida di cui sopra, risolvere il problema come segue:

- Omettere pozzetti (vedere [“Omissione di pozzetti dall'analisi” a pagina 102](#)).
- oppure
- Eseguire l'esperimento nuovamente.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni su:

- Schermata Standard Curve (Curva standard), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.
- Efficienza di amplificazione, fare riferimento alla *nota applicativa Amplification Efficiency of TaqMan[®] Gene Expression Assays*.

Note

Visualizzazione del plot di amplificazione

La schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) visualizza l'amplificazione di tutti i campioni nei pozzetti selezionati. Sono disponibili tre plot:

- **ΔR_n rispetto al ciclo** – $\Delta L'R_n$ è la grandezza del segnale di fluorescenza normalizzato generato dalla sessione di analisi PCR e dai dati relativi a esso viene calcolato il C_T . Questo plot visualizza il ΔR_n come funzione del numero di cicli. È possibile utilizzare questo plot per identificare ed esaminare l'amplificazione non regolare e per visualizzare i valori soglia e linea di base per la sessione di analisi.
- **R_n rispetto al ciclo** – $L'R_n$ rappresenta la fluorescenza del colorante reporter normalizzata. Questo plot visualizza $L'R_n$ come funzione del numero di cicli. È possibile utilizzare questo plot per l'identificazione e l'esame dell'amplificazione non regolare.
- **C_T rispetto al pozzetto** – Il ciclo soglia (C_T) è il numero di cicli PCR al quale il livello di fluorescenza raggiunge la soglia. Questo plot visualizza C_T come funzione della posizione del pozzetto. È possibile utilizzare questo plot per localizzare l'amplificazione anomala (outlier).

È possibile visualizzare ciascun plot con le seguenti modalità grafiche: lineare oppure log10.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, viene rivisualizzato il target nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) per:

- Valori corretti della linea di base e della soglia
- Outlier

Visualizzazione Plot di amplificazione

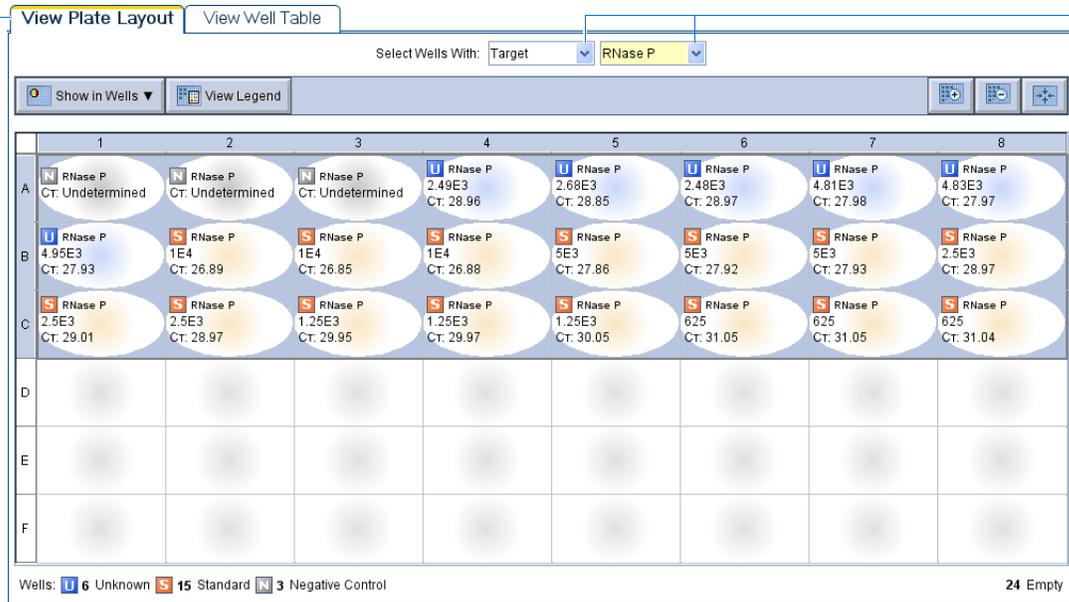
1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **Amplification Plot (Plot di amplificazione)**.

Nota: Qualora non venga visualizzato alcun dato nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

2. Visualizzare i pozzetti RNase P nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione):
 - a. Fare clic sulla scheda **View Plate Layout (Visualizza layout piastra)**.
 - b. Nei menu a discesa **Select Wells With (Seleziona pozzetti con)**, selezionare **Target**, quindi **RNase P**.

Note _____

2a



2b

3. Nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione):

- a. Nel menu a discesa Plot Type (Tipo plot), selezionare **ΔRn rispetto al ciclo**.
- b. Nel menu a discesa Color Plot By (Plot colore da), selezionare **Well (Pozzetto)**.
- c. Fare clic su **Show/Hide the plot legend (Mostra/Nascondi la legenda del plot)**.

4. Visualizzare i valori della linea di base:

- a. Nel menu a discesa Graph Type (Tipo grafico), selezionare **Linear (Lineare)**.
- b. Selezionare la casella di controllo **Baseline (Linea di base)** per visualizzare il ciclo di avvio e quello finale.
- c. Verificare che la linea di base sia impostata correttamente. Nell'esperimento di esempio, la linea di base viene impostata prima dell'avvio dell'amplificazione.

Note



5. Visualizzare i valori soglia:

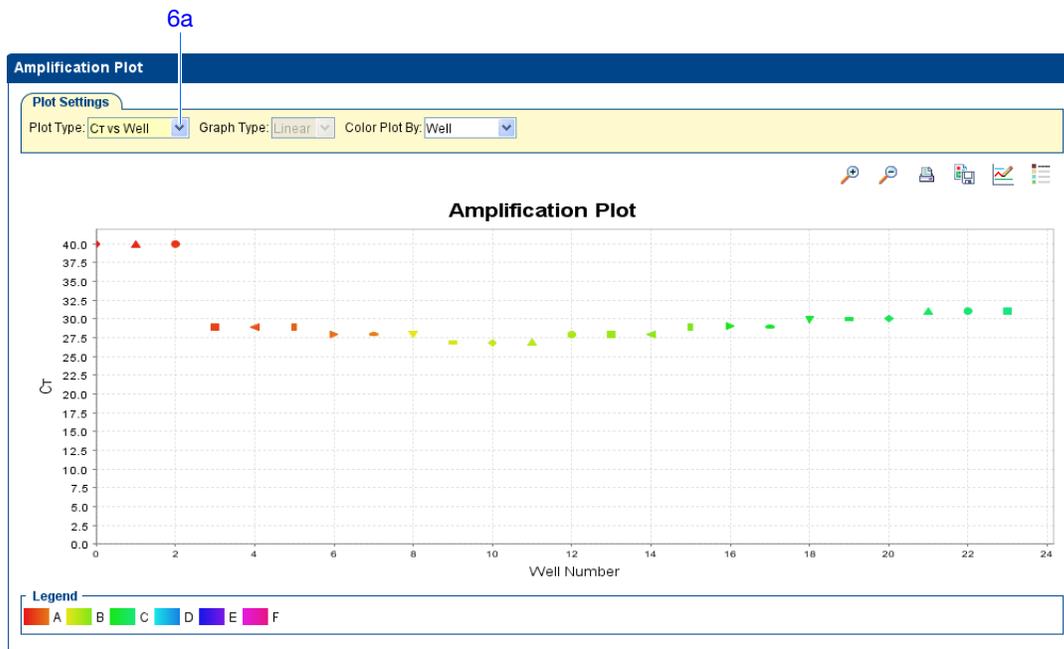
- a. Nel menu a discesa Graph Type (Tipo grafico), selezionare **Log (Logaritmico)**.
- b. Nel menu a discesa Target, selezionare **RNase P**.
- c. Selezionare la casella di controllo **Threshold (Soglia)** per visualizzare la soglia.
- d. Verificare che la soglia sia impostata correttamente. Nell'esperimento di esempio, la soglia si trova nella fase esponenziale.

Note



6. Localizzare eventuali outlier:

- Nel menu a discesa Plot Type (Tipo plot), selezionare C_T vs Well (Ct rispetto al pozzetto).
- Identificare i pozzetti esterni alla curva di amplificazione. Nell'esperimento di esempio, non sono presenti outlier per l'RNase P.

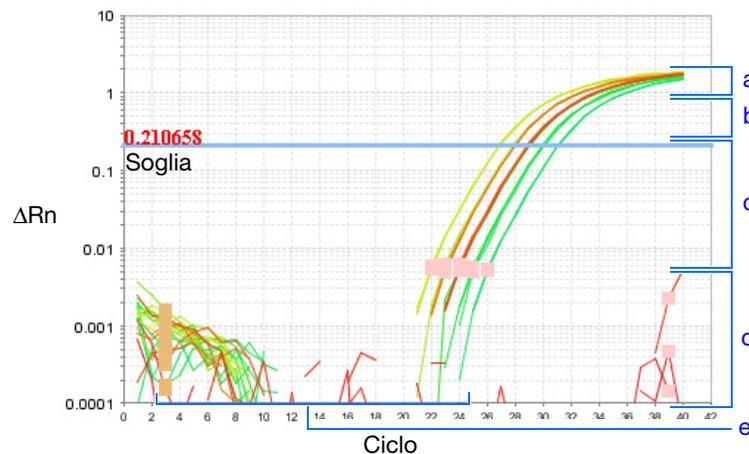


Note

Linee guida per l'analisi

Per analizzare il proprio esperimento con curva standard, calcolare:

- Valori linea di base e soglia corretti – Il software StepOne calcola automaticamente i valori della linea di base e della soglia ipotizzando che i dati presentino un *plot di amplificazione* tipico. Un plot di amplificazione tipico presenta:
 - a. Fase di plateau
 - b. Fase lineare
 - c. Esponenziale (fase geometrica)
 - d. Background
 - e. Linea di base



IMPORTANTE! È possibile che l'errore sperimentale (come contaminazione oppure errori di pipettaggio) possa produrre curve di amplificazione atipiche che risultano in calcoli errati dei valori della linea di base e della soglia eseguiti dal software StepOne. Quindi, dopo il completamento dell'analisi, Applied Biosystems raccomanda l'esame della schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) e la rivisualizzazione dei valori di linea di base e di soglia per ogni pozzetto.

- Outlier

Nel caso l'esperimento non sia conforme alle linee guida di cui sopra, risolvere il problema come segue:

- Regolare manualmente la linea di base e/o la soglia (vedere [“Visualizzazione delle impostazioni di analisi”](#) a pagina 98).
- oppure
- Omettere pozzetti (vedere [“Omissione di pozzetti dall'analisi”](#) a pagina 102).

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulla schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Note

Visualizzazione della tabella dei pozzetti

La scheda View Well Table (Visualizza tabella pozzetti) visualizza i dati per ogni pozzetto nella piastra di reazione, inclusi:

- Il nome del campione, il nome del target, l'operazione e i coloranti
- I valori calcolati del ciclo soglia (C_T), della fluorescenza normalizzata (R_n) e della quantità
- Commenti
- Indicatori

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, rivedere quanto segue nella tabella dei pozzetti:

- Valori di quantità
- Indicatori
- Valori C_T (inclusa deviazione standard C_T)

Visualizzazione tabella pozzetti

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)**, quindi selezionare la scheda **View Well Table (Visualizza tabella pozzetti)**.

Nota: Se non viene visualizzato alcun dato nella tabella Well (Pozzetto), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

2. Utilizzare il menu a discesa Group By (Raggruppa per) per raggruppare i pozzetti in base a una specifica categoria. Per l'esperimento di esempio, raggruppare i pozzetti per replicati, per indicatore oppure per valore C_T .

Nota: È possibile selezionare solo una categoria per volta.

- a. Nel menu a discesa Group By (Raggruppa per), selezionare **Replicate (Replicati)**. Il software raggruppa i pozzetti dei replicati: controllo negativo, standard e campioni. Nell'esperimento di esempio, notare che i valori della quantità all'interno di ogni gruppo di replicati sono simili.

Nota: Nell'esperimento di esempio, le colonne Quantity (Quantità), Quantity Mean (Media quantità) e Quantity SD (DS della quantità) sono state spostate dalle loro posizioni predefinite all'inizio della tabella Well (Pozzetti). Per spostare una colonna, fare clic e trascinare sull'intestazione della colonna.

Note

2a

#	Well	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD
RNase P													
1	A1				<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
2	A2				<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
3	A3				<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
RNase P - 10000.0													
4	B2	10,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556	0
5	B3	10,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556	0
6	B4	10,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556	0
RNase P - 1250.0													
7	C3	1,250			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813	0
8	C4	1,250			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813	0
9	C5	1,250			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813	0
RNase P - 2500.0													
10	B8	2,500			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377	0
11	C1	2,500			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377	0
12	C2	2,500			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377	0
RNase P - 5000.0													
13	B5	5,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566	0
14	B6	5,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566	0
15	B7	5,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566	0
RNase P - 625.0													
16	C6	625			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0
17	C7	625			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0

- b. Nel menu a discesa Group By (Raggruppa per), selezionare **Flag (Indicatore)**. Il software raggruppa i pozzetti con indicatore e quelli senza indicatore. Nell'esperimento di esempio, non sono presenti pozzetti senza indicatore.

2b

#	Well	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Rn	ΔRn	Quantity	
Unflagged Wells														
1	A1	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined			0	0.617	0	
2	A2	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined			0	0.563	-0	
3	A3	<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined			0	0.583	0.005	
4	A4	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNK:NOWN	FAM-NFQ-MGB	28.962868	28.928793		0.065	2.296	1.72	2,494.306
5	A5	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNK:NOWN	FAM-NFQ-MGB	28.853785	28.928793		0.065	2.344	1.764	2,681.857
6	A6	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNK:NOWN	FAM-NFQ-MGB	28.96972	28.928793		0.065	2.313	1.739	2,482.971
7	A7	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNK:NOWN	FAM-NFQ-MGB	27.976233	27.958857		0.024	2.366	1.796	4,805.449
8	A8	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNK:NOWN	FAM-NFQ-MGB	27.96848	27.958857		0.024	2.355	1.789	4,830.276
9	B1	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNK:NOWN	FAM-NFQ-MGB	27.931858	27.958857		0.024	2.426	1.796	4,949.284
10	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556		0.021	2.422	1.851	10,000
11	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556		0.021	2.464	1.874	10,000
12	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556		0.021	2.459	1.873	10,000
13	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566		0.039	2.413	1.834	5,000
14	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566		0.039	2.391	1.818	5,000
15	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566		0.039	2.366	1.801	5,000
16	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377		0.021	2.264	1.705	2,500
17	C1	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377		0.021	2.338	1.71	2,500
18	C2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377		0.021	2.28	1.698	2,500
19	C3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813		0.053	2.208	1.622	1,250
20	C4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813		0.053	2.229	1.643	1,250
21	C5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813		0.053	2.176	1.601	1,250
22	C6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659		0.01	2.074	1.400	625

Note

- c. Nel menu a discesa Group By (Raggruppa per), selezionare C_T . Il software raggruppa i pozzetti per il valore di C_T : basso, medio, alto e indeterminato. Nell'esperimento di esempio, i valori C_T cadono all'interno del range atteso (>8 e <35).

2c

#	Well	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Ct	Ct Mean	Ct SD	Rn	ΔRn	Quantity
Low (Ct less than 24)													
Medium (Ct from 24 to 30)													
1	A4	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNI.NOWN	FAM-NFQ-MGB	28.962868	28.928793	0.065	2.296	1.72	2,494.306
2	A5	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNI.NOWN	FAM-NFQ-MGB	28.853785	28.928793	0.065	2.344	1.764	2,681.857
3	A6	<input type="checkbox"/>		pop1	RNase P	UNI.NOWN	FAM-NFQ-MGB	28.96972	28.928793	0.065	2.313	1.739	2,482.971
4	A7	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNI.NOWN	FAM-NFQ-MGB	27.976233	27.958857	0.024	2.366	1.796	4,805.445
5	A8	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNI.NOWN	FAM-NFQ-MGB	27.96848	27.958857	0.024	2.355	1.789	4,830.276
6	B1	<input type="checkbox"/>		pop2	RNase P	UNI.NOWN	FAM-NFQ-MGB	27.931858	27.958857	0.024	2.426	1.796	4,949.284
7	B2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556	0.021	2.422	1.851	10,000
8	B3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556	0.021	2.464	1.874	10,000
9	B4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556	0.021	2.459	1.873	10,000
10	B5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566	0.039	2.413	1.834	5,000
11	B6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566	0.039	2.391	1.818	5,000
12	B7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566	0.039	2.366	1.801	5,000
13	B8	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377	0.021	2.264	1.705	2,500
14	C1	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377	0.021	2.338	1.71	2,500
15	C2	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377	0.021	2.28	1.698	2,500
16	C3	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813	0.053	2.208	1.622	1,250
17	C4	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813	0.053	2.229	1.643	1,250
High (Ct greater than 30)													
18	C5	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813	0.053	2.176	1.601	1,250
19	C6	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0.01	2.074	1.499	625
20	C7	<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0.01	2.071	1.51	625

Linee guida analisi

Per analizzare il proprio esperimento con curva standard, raggruppare i pozzetti per:

- **Replicati** – Il software raggruppa i pozzetti per replicati: controllo negativo, standard e campioni. Osservare le colonne Quantity (Quantità) per accertarsi che i valori di quantità per ogni gruppo di replicati siano simili. Ciò indica un'estrema precisione.
- **Indicatore** – Il software raggruppa i pozzetti con indicatore e quelli senza indicatore. Un indicatore segnala che il software ha rilevato un errore nel pozzetto con indicatore. Per una descrizione degli indicatori del software StepOne, vedere [“Visualizzazione del riepilogo QC” a pagina 100](#).
- **C_T** – Il ciclo soglia (C_T) è il numero di cicli PCR al quale la fluorescenza raggiunge la soglia. Un valore di $C_T >8$ e <35 è auspicabile. Un valore di $C_T <8$ indica la presenza eccessiva di template nella reazione. Un valore di $C_T >35$ indica una scarsa quantità di target nella reazione; per valori $C_T >35$, si attende una deviazione standard maggiore.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulla tabella Well (Pozzetti), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su oppure premendo **F1**.

Pubblicazione dei dati

È possibile pubblicare i dati dell'esperimento in numerosi modi:

- Salvare il plot come un file immagine
- Stampare il plot
- Stampare il layout di piastra
- Creare diapositive
- Stampare un rapporto
- Esportare i dati

Per ulteriori informazioni sulle procedure in oggetto, accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Note

Note

Sezione 5.2 Risoluzione problemi (se necessario)

Questa sezione comprende i paragrafi:

■ Visualizzazione delle impostazioni di analisi	98
■ Visualizzazione del riepilogo QC	100
■ Omissione di pozzetti dall'analisi	102
■ Visualizzazione del plot multicomponente	104
■ Visualizzazione del plot dei dati non elaborati	106

Note

Visualizzazione delle impostazioni di analisi

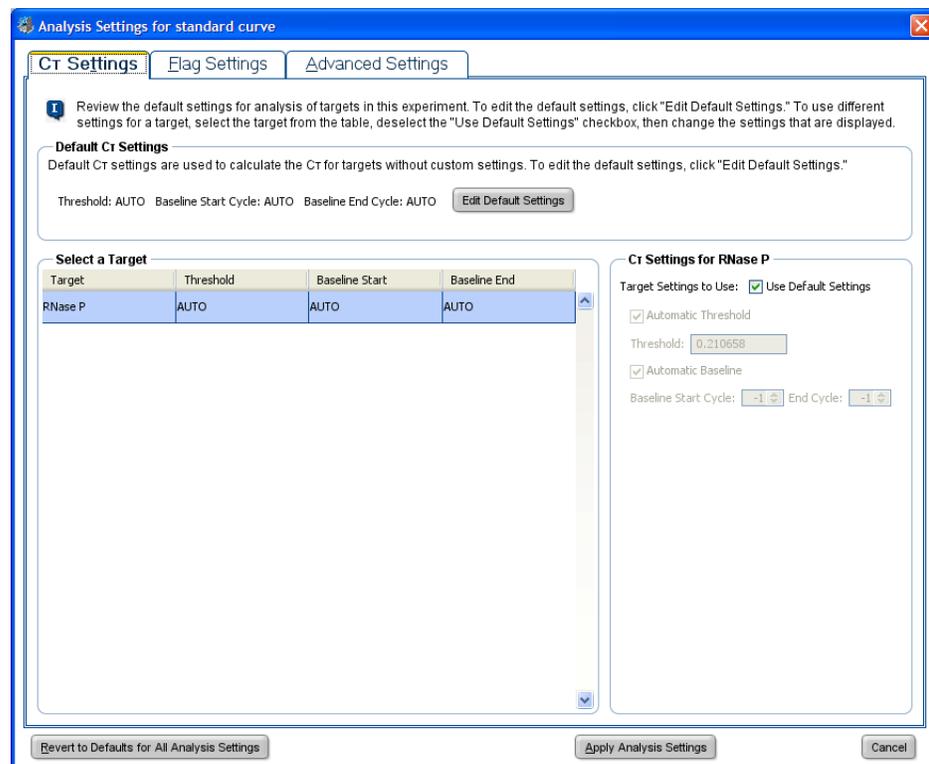
La finestra di dialogo Analysis Settings (Impostazioni di analisi) visualizza le impostazioni di analisi per il ciclo soglia (C_T), gli indicatori e le opzioni avanzate. Se le impostazioni di analisi predefinite del software StepOne non sono adeguate per l'esperimento, è possibile modificare le impostazioni nella finestra di dialogo Analysis Settings (Impostazioni di analisi) e quindi rianalizzare l'esperimento.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, vengono utilizzate le impostazioni di analisi predefinite senza alcuna modifica.

Visualizzazione delle impostazioni di analisi

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)**.
2. Fare clic su **Analysis Settings (Impostazioni di analisi)** per aprire la finestra di dialogo Analysis Settings (Impostazioni di analisi).
3. Nell'esperimento di esempio, vengono utilizzate le impostazioni di analisi predefinite per ciascuna scheda:
 - Impostazioni C_T
 - Impostazioni indicatore
 - Impostazioni avanzate



Note

Linee guida analisi

A meno che non siano già state determinate le impostazioni ottimali per l'esperimento, utilizzare le impostazioni di analisi predefinite del software StepOne. Nel caso le impostazioni predefinite non siano adeguate per l'esperimento, è possibile modificare le:

- **Impostazioni C_T** – Utilizzare questa scheda per impostare manualmente la soglia e la linea di base. Nel caso in cui la soglia e la linea di base vengano impostate manualmente, Applied Biosystems raccomanda quanto segue:

Impostazione	Raccomandazione
Soglia	Immettere un valore per la soglia in modo che la soglia sia: <ul style="list-style-type: none"> • Al di sopra del background. • Al di sotto del plateau e delle regioni lineari della curva di amplificazione. • All'interno della fase esponenziale della curva di amplificazione.
Linea di base	Selezionare i valori del ciclo di avvio e del ciclo finale in modo che la linea di base termini prima dell'avvio dell'amplificazione.

- **Impostazioni indicatore** – Utilizzare questa scheda per:
 - Regolare la sensibilità in modo che un numero maggiore o minore di pozzetti presentino un indicatore.
 - Modificare gli indicatori applicati dal software StepOne.
- **Impostazioni avanzate** – Utilizzare questa scheda per modificare le impostazioni della linea di base pozzetto per pozzetto.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulle impostazioni di analisi, accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne premendo **F1** quando la finestra di dialogo Analysis Settings (Impostazioni analisi) è aperta.

Note

Visualizzazione del riepilogo QC

La schermata QC Summary (Riepilogo CQ) visualizza un elenco di indicatori del software StepOne e include la frequenza e la posizione dell'indicatore per l'esperimento aperto.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, viene rivisualizzata la schermata QC Summary (Riepilogo CQ) per individuare eventuali indicatori attivati dai dati dell'esperimento. Nell'esperimento di esempio, non viene attivato alcun indicatore.

Visualizzazione del riepilogo CQ

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **QC Summary (Riepilogo CQ)**.

Nota: Se non viene visualizzato alcun dato nella schermata QC Summary (Riepilogo CQ), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

2. Riivedere il riepilogo indicatori. Nell'esperimento di esempio, sono presenti 0 pozzetti con indicatore.
3. Nella tabella Flag Details (Dettagli indicatore), osservare le colonne Frequency (Frequenza) e Wells (Pozzetti) per determinare quali indicatori compaiono nell'esperimento. Nell'esperimento di esempio, la colonna Frequency (Frequenza) visualizza 0 per tutti gli indicatori.

Nota: Lo 0 visualizzato nella colonna Frequency (Frequenza) indica che l'indicatore non compare nell'esperimento.

4. (Opzionale) Fare clic su ogni riga di indicatore per visualizzare informazioni dettagliate sull'indicatore stesso.

Note

QC Summary

Flag Summary

Total Wells:	48	Processed Wells:	24	Targets Used:	1
Wells Set Up:	24	Flagged Wells:	0	Samples Used:	2

Flag Details

Flag	Name	Frequency	Wells
AMPNC	Amplification in negative control	0	
BADROX	Bad passive reference signal	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	0	
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	

Flag AMPNC—Amplification in negative control

Flag Detail: A sequence amplified in a negative control reaction.

Flag Criteria: $C_T < 35.0$

Flagged Wells: None

[View AMPNC Troubleshooting Information](#)

Possibili indicatori

Nell'esperimento di esempio con curva standard, è possibile l'attivazione da parte dei dati dell'esperimento degli indicatori elencati qui di seguito.

Se un indicatore non compare nell'esperimento, la sua frequenza è 0. Se la frequenza è >0 , l'indicatore compare in qualche punto dell'esperimento; la posizione del pozzetto è elencata nella colonna Wells (Pozzetti).

Indicatore	Descrizione
AMPNC	Amplificazione nel controllo negativo
BADROX	Cattivo segnale di riferimento passivo
BLFAIL	Algoritmo linea di base non riuscito
CTFAIL	Algoritmo C_T non riuscito
EXPFAIL	Algoritmo esponenziale non riuscito
HIGHSD	Alta deviazione standard nel gruppo di replicati
NOAMP	Nessuna amplificazione
NOISE	Disturbo più elevato rispetto alla norma nella piastra
NOSIGNAL	Nessun segnale nel pozzetto
OFFSCALE	La fluorescenza è fuori scala
OUTLIERRG	Outlier nel gruppo di replicati
SPIKE	Picchi di disturbo
THOLDFAIL	Algoritmo raggiungimento soglia non riuscito

Note

Linee guida analisi

Per analizzare il proprio esperimento con curva standard:

- Fare clic nella tabella Flag Details (Dettagli indicatore) su ogni indicatore con una frequenza >0 per visualizzare informazioni dettagliate sull'indicatore. Se necessario, fare clic sul collegamento (link) risoluzione problemi per visualizzare le informazioni sulla correzione dell'indicatore.
- È possibile modificare le impostazioni dell'indicatore:
 - Regolare la sensibilità in modo che un numero maggiore o minore di pozzetti presentino un indicatore.
 - Modificare gli indicatori applicati dal software StepOne.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulla schermata QC Summary (Riepilogo CQ) oppure sulle impostazioni degli indicatori, accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Omissione di pozzetti dall'analisi

Gli errori sperimentali potrebbero provocare l'assenza o la insufficienza dell'amplificazione di alcuni pozzetti. Questi pozzetti producono di solito valori C_T che differiscono in modo significativo dalla media per i pozzetti di replicati associati. Se inclusi nei calcoli, è possibile che questi dati anomali (outlier) possano portare a misurazioni errate; per garantire precisione, omettere i dati anomali dall'analisi.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, non è presente alcun outlier; non è necessario rimuovere pozzetti dall'analisi.

Omissione di pozzetti

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **Amplification Plot (Plot di amplificazione)**.

Nota: Qualora non venga visualizzato alcun dato nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

2. Nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), selezionare C_T **rispetto al pozzetto** nel menu a discesa Plot Type (Tipo plot).
3. Selezionare la scheda **View Well Table (Visualizza tabella pozzetti)**.
4. Nella tabella pozzetti:
 - a. Nel menu a discesa Group By (Raggruppa per), selezionare **Replicate (Replicati)**.
 - b. Cercare eventuali outlier nel gruppo di replicati (verificare che essi presentino un indicatore). Nell'esperimento di esempio, non sono presenti outlier.

Note

#	Well	Quantity	Quantity Mean	Quantity SD	Omit	Flag	Sample N...	Target N...	Task	Dyes	Cr	Cr Mean	Cr SD
RNase P													
1	A1				<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
2	A2				<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
3	A3				<input type="checkbox"/>			RNase P	NTC	FAM-NFQ-MGB	Undetermined		
RNase P - 10000.0													
4	B2	10,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.890259	26.874556	0
5	B3	10,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.85095	26.874556	0
6	B4	10,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	26.882454	26.874556	0
RNase P - 1250.0													
7	C3	1,250			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.949043	29.989813	0
8	C4	1,250			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.9701	29.989813	0
9	C5	1,250			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	30.050293	29.989813	0
RNase P - 2500.0													
10	B8	2,500			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.97373	28.981377	0
11	C1	2,500			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	29.005375	28.981377	0
12	C2	2,500			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	28.965023	28.981377	0
RNase P - 5000.0													
13	B5	5,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.860065	27.904566	0
14	B6	5,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.921917	27.904566	0
15	B7	5,000			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	27.931719	27.904566	0
RNase P - 625.0													
16	C6	625			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.05255	31.04659	0
17	C7	625			<input type="checkbox"/>			RNase P	STANDARD	FAM-NFQ-MGB	31.062055	31.04659	0

Linee guida analisi

Per analizzare il proprio esperimento con curva standard, visualizzare con cura i gruppi di replicati per individuare eventuali outlier. Se necessario, rimuovere manualmente gli outlier utilizzando la tabella Well (Pozzetto):

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **Amplification Plot (Plot di amplificazione)**.

Nota: Qualora non venga visualizzato alcun dato nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

2. Nella schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione), selezionare **C_T rispetto al pozzetto** nel menu a discesa Plot Type (Tipo plot).
3. Selezionare la scheda **View Well Table (Visualizza tabella pozzetti)**.
4. Nella tabella dei pozzetti:
 - a. Nel menu a discesa Group By (Raggruppa per), selezionare **Replicate (Replicati)**.
 - b. Cercare eventuali outlier nel gruppo di replicati (verificare che essi presentino un indicatore).
 - c. Selezionare la casella di controllo **Omit (Ometti)** adiacente ai pozzetti che presentano valori anomali.
5. Fare clic su **Analyze (Analizza)** per rianalizzare i dati dell'esperimento dopo la rimozione dall'analisi dei pozzetti con valori anomali.

Note

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sull'omissione di pozzetti dall'analisi, accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**. All'interno della voce Help (Guida), individuare gli argomenti relativi alla omissione dei pozzetti:

1. Fare clic sulla scheda **Search (Ricerca)**.
2. Immettere **omit well (ometti pozzetto)**.
3. Fare clic su **List Topics (Elenca argomenti)**.
4. Fare doppio clic sugli argomenti da rivedere.

Visualizzazione del plot multicomponente

La schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente) visualizza il contributo spettrale completo di ogni colorante in un pozzetto selezionato per tutta la durata della sessione di analisi PCR.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, viene rivisualizzata la schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente) per:

- Colorante ROX™ (riferimento passivo)
- Colorante FAM™ (reporter)
- Picchi, flessioni e/o cambiamenti repentini
- Amplificazione nei pozzetti di controllo negativo

Visualizzazione del plot multicomponente

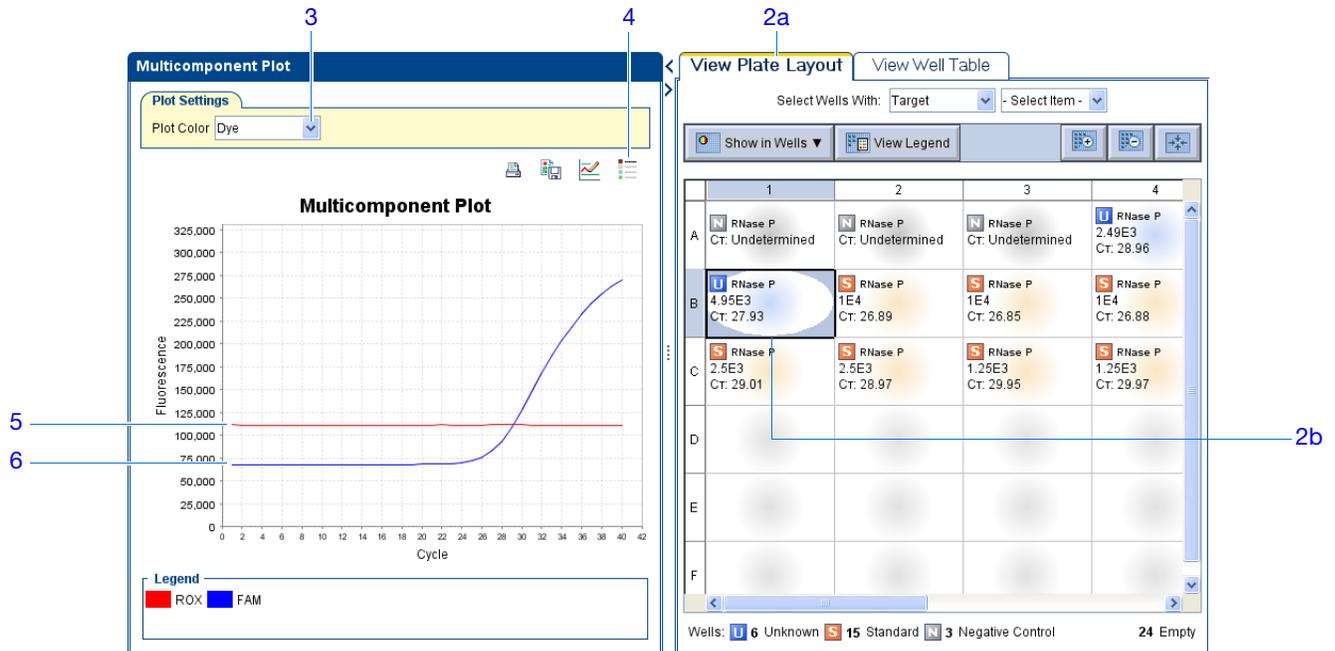
1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **Multicomponent Plot (Plot multicomponente)**.

Nota: Qualora non venga visualizzato alcun dato nella schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

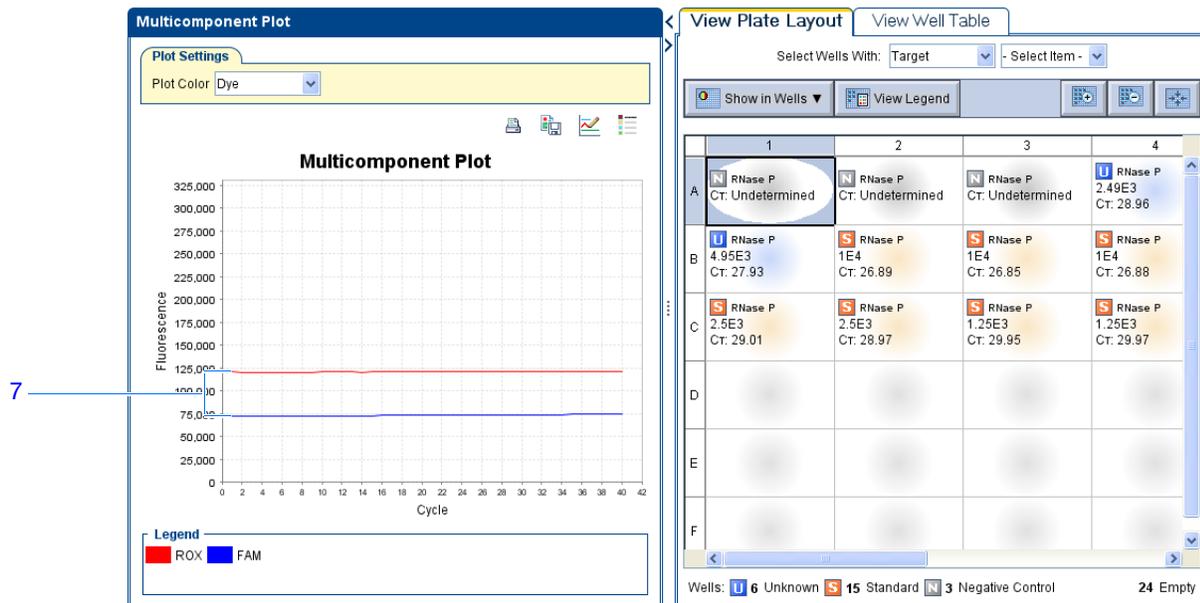
2. Visualizzare un pozzetto alla volta nella schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente):
 - a. Fare clic sulla scheda **View Plate Layout (Visualizza layout piastra)**.
 - b. Selezionare un pozzetto nel layout di piastra; il pozzetto viene visualizzato nella schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente).
3. Nel menu a discesa Plot Color (Colore plot), selezionare **Dye (Colorante)**.
4. Fare clic su  **Show/Hide the plot legend (Mostra/Nascondi la legenda del plot)**.
5. Controllare il segnale del colorante ROX. Nell'esperimento di esempio, il segnale del colorante ROX si mantiene costante durante il processo PCR, il che indica dati tipici.

Note

- Controllare il segnale del colorante FAM. Nell'esperimento di esempio, il segnale del colorante FAM aumenta durante il processo PCR, il che indica una amplificazione normale.



- Selezionare i pozzetti di controllo negativo uno alla volta e controllare l'amplificazione. Nell'esperimento di esempio, non è presente amplificazione nei pozzetti di controllo negativo.



Note

Linee guida analisi

Per analizzare il proprio esperimento con curva standard, calcolare:

- Riferimento passivo – Il livello di fluorescenza del colorante di riferimento passivo deve mantenersi relativamente costante durante il processo PCR.
- Colorante reporter – Il livello di fluorescenza del colorante reporter deve visualizzare un'area piana in corrispondenza della linea di base, seguita da un rapido aumento della fluorescenza con il procedere dell'amplificazione.
- Eventuali irregolarità nel segnale – Non devono essere presenti picchi, flessioni e/o cambiamenti repentini nel segnale fluorescente.
- Pozzetti di controllo negativi – Non deve essere presente amplificazione nei pozzetti di controllo negativo.

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulla schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Visualizzazione del plot dei dati non elaborati

La schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati) visualizza il segnale di fluorescenza non elaborato (non normalizzato) per ogni filtro ottico per i pozzetti selezionati durante ciascun ciclo della PCR in tempo reale.

Informazioni sull'esperimento di esempio

Nell'esperimento di esempio con curva standard, viene rivisualizzata la schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati) per osservare un aumento stabile del segnale (nessun cambiamento brusco o flessioni) dal filtro appropriato.

Visualizzazione del plot dei dati non elaborati

1. Nel pannello Experiment Menu (Menu esperimento), selezionare **Analysis (Analisi)** ►  **Raw Data Plot (Plot dati non elaborati)**.

Nota: Qualora non venga visualizzato alcun dato nella schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati), fare clic su **Analyze (Analizza)**.

2. Visualizzare tutti i 48 pozzetti nella schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati) facendo clic sull'angolo in alto a sinistra del layout di piastra nella scheda View Plate Layout (Visualizza layout di piastra).
3. Fare clic su  **Show/Hide the plot legend (Mostra/Nascondi la legenda del plot)**.
4. Fare clic e trascinare il puntatore Show Cycle (Visualizza ciclo) dal ciclo 1 al ciclo 40. Nell'esperimento di esempio, è presente un aumento stabile del segnale proveniente dal filtro 1, che corrisponde al filtro del colorante FAM™.

Note



I filtri del sistema StepOne™ sono:

Filtro	Colorante
1	Colorante FAM™
	Colorante SYBR® Green
2	Colorante JOE™
	Colorante VIC®
3	Colorante ROX™

Linee guida per l'analisi

Per analizzare il proprio esperimento con curva standard, ricercare in ogni filtro:

- Crescita caratteristica del segnale
- Assenza di cambiamenti bruschi o flessioni

Per ulteriori informazioni

Per ulteriori informazioni sulla schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati), accedere alla voce Help (Guida) del software StepOne facendo clic su  oppure premendo **F1**.

Note

Note



Ulteriori flussi di lavoro degli esperimenti

A

L'appendice comprende:

- Flusso di lavoro impostazione avanzata 110
- Flusso di lavoro avvio rapido 111
- Flusso di lavoro del template 112
- Flusso di lavoro esportazione/importazione 113

Nota: Per ulteriori informazioni sugli argomenti trattati in questa guida, accedere alla voce Help (Guida) nel software del sistema Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System premendo **F1**, facendo clic su  nella barra degli strumenti oppure selezionando **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

Note

Flusso di lavoro impostazione avanzata

Quando si crea un esperimento con curva standard utilizzando il flusso di lavoro dell'impostazione avanzata del software StepOne™, è possibile impostare l'esperimento in base al proprio disegno.

1. Impostare un nuovo esperimento:

- a. Fare doppio clic su  (collegamento software StepOne) oppure selezionare **Start (Avvio) ▶ All Programs (Tutti i programmi) ▶ Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0.**
- b. Nella colonna Set Up (Imposta), fare clic su  **Advanced Setup (Impostazione avanzata).**
- c. Nel pannello di navigazione, fare clic su  **Experiment Properties (Proprietà esperimento)** (predefinito), quindi immettere le proprietà per l'esperimento di esempio.
- d. Nel pannello di navigazione, fare clic su  **Plate Setup (Imposta piastra)**, quindi assegnare i target, gli standard e i campioni.
- e. Nel pannello di navigazione, fare clic su  **Run Method (Metodo di esecuzione)**, quindi immettere il volume di reazione e modificare il profilo termico secondo le necessità.
- f. Nel pannello di navigazione, fare clic su  **Reaction Setup (Imposta reazione)**, quindi rivedere i volumi calcolati per le reazioni PCR, le serie di diluizioni standard e le diluizioni del campione. Modificare se necessario.
- g. (Opzionale) Nel pannello di navigazione, fare clic su  **Materials List (Elenco materiali)**, quindi selezionare e ordinare i materiali necessari per l'esperimento.

2. Preparare le reazioni PCR:

- a. Preparare il template.
- b. Preparare le diluizioni del campione.
- c. Preparare le serie di diluizioni standard.
- d. Preparare la miscela di reazione.
- e. Preparare la piastra di reazione.

3. Eseguire l'esperimento:

- a. Caricare lo strumento.
- b. Avviare l'esecuzione.
- c. Scaricare lo strumento.

4. Analizzare i dati.

Note

Flusso di lavoro avvio rapido

Quando viene creato un esperimento con curva standard utilizzando il flusso di lavoro avvio rapido, è possibile eseguire le reazioni sullo strumento senza le informazioni di impostazione della piastra.

1. Preparare le reazioni PCR:
 - a. Preparare il template.
 - b. Preparare le diluizioni del campione.
 - c. Preparare le serie di diluizioni standard.
 - d. Preparare la miscela di reazione.
 - e. Preparare la piastra di reazione.
2. Eseguire l'avvio rapido dell'esperimento:
 - a. Fare doppio clic su  (collegamento software StepOne) oppure selezionare **Start (Avvio) ▶ All Programs (Tutti i programmi) ▶ Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0**.
 - b. Nella colonna Run (Esegui), fare clic su  **QuickStart (Avvio rapido)**.
 - c. Selezionare la scheda **Experiment Properties (Proprietà esperimento)**, quindi immettere le proprietà per l'esperimento.
 - d. Selezionare la scheda **Run Method (Metodo di esecuzione)**, quindi immettere il volume di reazione e modificare il profilo termico secondo le necessità.
3. Eseguire l'esperimento:
 - a. Caricare lo strumento.
 - b. Avviare l'esecuzione.
 - c. Scaricare lo strumento.
4. Completare l'impostazione della piastra.
5. Analizzare i dati.

Note

Flusso di lavoro del template

Quando viene creato un template per un esperimento con curva standard, è possibile impostare molti esperimenti con le stesse informazioni di impostazione.

1. Creare un template:

- a. Fare doppio clic su  (collegamento software StepOne) oppure selezionare **Start (Avvio) ▶ All Programs (Tutti i programmi) ▶ Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0.**
- b. Aprire un esperimento già esistente oppure creare un nuovo esperimento come descritto nel [Capitolo 2](#).
- c. Selezionare **File ▶ Save As Template (Salva come template).**
- d. Nella finestra di dialogo Save As Template (Salva come template), immettere un nome di file, quindi fare clic su **Save (Salva)** per salvare il template.
- e. Fare clic su  **Close (Chiudi).**

2. Creare un esperimento utilizzando il template:

- a. Nel caso la schermata visualizzata non sia quella Home, fare clic su **Home**.
- b. Nella colonna Set Up (Imposta), fare clic su  **Template (Template).**
- c. Nella finestra di dialogo Open (Apri), selezionare il template creato nel [passaggio 1](#).
- d. Modificare l'esperimento utilizzando gli strumenti nel flusso di lavoro dell'impostazione avanzata.
- e. Fare clic su  **Save (Salva)**, immettere un nome di un file, quindi fare clic su **Save (Salva)** per salvare l'esperimento.

3. Preparare le reazioni PCR:

- a. Preparare il template.
- b. Preparare le diluizioni del campione.
- c. Preparare le serie di diluizioni standard.
- d. Preparare la miscela di reazione.
- e. Preparare la piastra di reazione.

4. Eseguire l'esperimento:

- a. Caricare lo strumento.
- b. Avviare l'esecuzione.
- c. Scaricare lo strumento.

5. Analizzare i dati.

Flusso di lavoro esportazione/importazione

Quando viene creato un esperimento con curva standard utilizzando il flusso di lavoro esportazione/importazione, è possibile impostare un nuovo esperimento utilizzando i dati esportati da altri esperimenti.

1. Fare doppio clic su  (collegamento software StepOne) oppure selezionare **Start (Avvio) ▶ All Programs (Tutti i programmi) ▶ Applied Biosystems ▶ StepOne ▶ StepOne v1.0**.
2. Aprire un esperimento già esistente oppure creare un nuovo esperimento come descritto nel [Capitolo 2](#).
3. Esportare le informazioni di impostazione mentre un esperimento è aperto:
 - a. Selezionare **File ▶ Export (Esporta)**.
 - b. Nella scheda Export Properties (Esporta proprietà), selezionare **Setup (Imposta)**.
 - c. Selezionare **One File (Un solo file)** nel menu a discesa.
 - d. Selezionare  (*.txt) nel menu a discesa File Type (Tipo file).
 - e. Selezionare **Open file(s) (Apri file) quando l'esportazione è completa**.
 - f. Fare clic su **Start Export (Avvia esportazione)**, quindi fare clic su **Close Export Tool (Chiudi strumento di esportazione)** quando indicato.

Note _____

4. Utilizzare il file esportato come un template e creare l'impostazione di piastra desiderata:
 - a. Utilizzando una applicazione con foglio elettronico (come il software Microsoft® Excel), aprire il file di testo esportato.
 - b. Sostituire i parametri del file di testo come necessario. Una volta finito, salvare il file come un file di testo delimitato da tabulazioni.

IMPORTANTE! Il file di testo deve essere formattato secondo il layout di piastra del software StepOne. Per ulteriori informazioni sul formato del layout di piastra, accedere alla voce Help (Guida) facendo clic su  nella barra degli strumenti, oppure selezionando **Help (Guida) ▶ StepOne Help (Guida StepOne)**.

5. Nel caso la schermata visualizzata non sia quella Home, fare clic su **Home**.
6. Nella colonna Set Up (Imposta), fare clic su  **Advanced Setup (Impostazione avanzata)**.
7. Importare le impostazioni di impostazione:
 - a. Selezionare **File ▶ Import (Importa)**.
 - b. Fare clic su **Browse (Sfogliare)**, selezionare il file *.txt creato al [passaggio 4](#), quindi fare clic su **Select (Seleziona)**.
 - c. Fare clic su **Start Import (Avvia importazione)**.
8. Preparare le reazioni PCR:
 - a. Preparare il template.
 - b. Preparare le diluizioni del campione.
 - c. Preparare le serie di diluizioni standard.
 - d. Preparare la miscela di reazione.
 - e. Preparare la piastra di reazione.
9. Eseguire l'esperimento:
 - a. Caricare lo strumento.
 - b. Avviare l'esecuzione.
 - c. Scaricare lo strumento.
10. Analizzare i dati.

Bibliografia

Kwok, S. and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., *et al.* 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.

acquisizione dati	<p>Processo durante la sessione analitica in cui un componente dello strumento rileva i dati sulla fluorescenza provenienti da ogni pozzetto della piastra di reazione. Lo strumento trasforma il segnale in dati elettronici e i dati vengono salvati nel file dell'esperimento. Un punto di acquisizione dati viene indicato da un'icona nel profilo termico:</p> <ul style="list-style-type: none">• Acquisizione dati attivata: • Acquisizione dati disattivata: 
agente bloccante IPC	<p>Reagente aggiunto alle reazioni PCR per bloccare l'amplificazione del controllo positivo interno (IPC).</p>
AIF	<p>Abbreviazione per File informazioni del saggio (AIF, Assay Information File).</p>
allele	<p>Rispetto a un determinato target, ognuna delle diverse sequenze che si verificano nella popolazione.</p>
amplicone	<p>Segmento di DNA amplificato durante la PCR.</p>
amplificazione	<p>Parte della sessione dello strumento durante la quale si verifica la PCR per la produzione dell'amplificazione del target. Per gli esperimenti di quantificazione, i dati sulla fluorescenza acquisiti durante l'amplificazione vengono visualizzati in un plot di amplificazione e utilizzati per calcolare i risultati. Se l'amplificazione viene inclusa nella sessione dello strumento StepOne™ per la genotipizzazione o per gli esperimenti di presenza/assenza, i dati sulla fluorescenza acquisiti durante l'amplificazione vengono visualizzati in un plot di amplificazione ed è possibile utilizzarli per la risoluzione dei problemi.</p>
Assay Mix	<p>Componente della reazione PCR in TaqMan® Gene Expression Assays e TaqMan® SNP Genotyping Assays di Applied Biosystems consistente in primer disegnati per l'amplificazione di un target e una sonda TaqMan® disegnata per il rilevamento dell'amplificazione del target.</p>
AutoΔ	<p>Impostazione per aumentare o diminuire la temperatura e/o il tempo ad ogni ciclo successivo in una fase ciclica. Quando AutoΔ è abilitato, le impostazioni vengono indicate da un'icona nel profilo termico:</p> <ul style="list-style-type: none">• AutoΔ attivato: • AutoΔ disattivato: 
C_T	<p>Abbreviazione per ciclo soglia.</p>
C_T automatico	<p>Impostazione di analisi in cui il software calcola automaticamente la soglia e la linea di base nel plot di amplificazione. Il software utilizza la soglia e la linea di base per calcolare il ciclo soglia (C_T).</p>

C_T manuale	Impostazione di analisi in cui viene immesso il valore soglia e viene selezionato se utilizzare calcoli con linea di base automatica o linea di base manuale. Il software utilizza il valore soglia immesso e la linea di base per calcolare il ciclo soglia (C _T).
calibratore	Vedere campione di riferimento.
calibrazione spaziale	Tipo di calibrazione del sistema StepOne™ in cui il sistema mappa le posizioni dei pozzetti nel blocco campione. I dati della calibrazione spirale vengono utilizzati in maniera tale che il software possa associare gli aumenti di fluorescenza durante una sessione analitica a pozzetti specifici nella piastra di reazione.
campione	Il template in corso di test.
campione di riferimento	In esperimenti con curva standard relativa e C _T (ΔΔC _T) comparativo, il campione viene utilizzato come base per i risultati di quantificazione relativa. Noto anche come calibratore.
Campione o Standard (10X)	Componente della reazione visualizzato sulla scheda Reaction Mix Calculations (Calcoli miscela reazione) della schermata Reaction Setup (Impostazione reazione). Il software presuppone che il campione o lo standard aggiunto alla miscela di reazione sia a una concentrazione 10X. Ad esempio, se il volume della reazione è 20 μl, il volume calcolato del campione o dello standard per la reazione 1 è di 2 μl.
chimica	Vedere reagenti.
ciclo soglia	Vedere ciclo soglia (C _T).
ciclo soglia (C_T)	Il numero del ciclo PCR in cui il ΔRn incontra la soglia nel plot di amplificazione.
coefficienti di regressione	Valori calcolati dalla linea di regressione nella curva standard, inclusi il valore R ² , la pendenza e l'intercetta y. È possibile utilizzare i valori del coefficiente di regressione per valutare la qualità dei risultati provenienti dagli standard. Vedere anche curva standard.
colorante di sistema	Colorante prodotto da Applied Biosystems e precalibrato sul sistema StepOne™. Coloranti di sistema: <ul style="list-style-type: none"> • Colorante FAM™ • Colorante JOE™ • Colorante ROX™ • Colorante SYBR® Green • Colorante VIC®

IMPORTANTE! Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRA™ come reporter o quencher con il sistema StepOne™.

colorante personalizzato	Colorante non prodotto da Applied Biosystems. È possibile utilizzare coloranti personalizzati per eseguire gli esperimenti PCR in tempo reale sul sistema StepOne™. Prima di utilizzare coloranti personalizzati, eseguire una calibrazione specifica per il colorante.
	<hr/> IMPORTANTE! Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRA™ come reporter o quencher con il sistema StepOne™. <hr/>
coloranti puri	Reagente che contiene il colorante del sistema. I coloranti vengono utilizzati per eseguire una calibrazione di colorante sul sistema StepOne™. Vedere anche colorante del sistema.
colore del target	Colore assegnato a un target per identificare il target nel layout piastra e nei plot di analisi.
Concentrazione del campione diluito (10× per Miscela di reazione)	Campo software visualizzato sulla scheda Sample Dilution Calculations (Calcoli diluizione campione) della schermata Reaction Setup (Impostazione reazione). Per questo campo, immettere la concentrazione del campione che si desidera utilizzare da aggiungere alla miscela di reazione per tutti i campioni nell'esperimento. "10× per Miscela di reazione" indica che il software presuppone che il componente campione o standard della miscela di reazione si trovi in concentrazione 10×. Ad esempio, se la concentrazione del campione diluito è di 50,0 ng/μl (10×), la concentrazione finale del campione nella reazione è di 5 ng/μl (1×).
configurazione co-locata	Disposizione del sistema in cui lo strumento StepOne™ è collegato direttamente a un computer co-locato dal cavo giallo del sistema StepOne™. In questa configurazione, lo strumento StepOne™ viene controllato attraverso il software StepOne™ presente sul computer co-locato.
configurazione indipendente	Disposizione del sistema in cui lo strumento StepOne™ non è collegato a un computer dal cavo giallo del sistema StepOne™. Viene invece utilizzata un'unità USB (🔌) per il trasferimento dei dati tra i componenti del sistema StepOne™. In questa configurazione, lo strumento StepOne™ viene controllato attraverso il touchscreen dello strumento stesso.
controllo endogeno	Target che deve essere agli stessi livelli in tutti i campioni da testare. Utilizzato negli esperimenti con curva standard relativa e C_T ($\Delta\Delta C_T$) comparativo per la normalizzazione dei segnali di fluorescenza per il target in corso di quantificazione. Noto anche come gene di riferimento.
controllo negativo (NC)	In esperimenti del sistema StepOne™, l'operazione assegnata ai target o ai saggi SNP in pozzetti che contengono acqua o buffer invece di un template di campione. Nei pozzetti di controllo negativi non deve verificarsi alcuna amplificazione del target.
controllo positivo	Negli esperimenti di genotipizzazione, l'operazione per il saggio SNP nei pozzetti che contengono un template di campione con un genotipo noto.
controllo positivo interno (IPC)	Negli esperimenti di presenza/assenza, template di DNA sintetico di piccole dimensioni che viene aggiunto alle reazioni della PCR. È possibile utilizzare l'IPC per distinguere tra i risultati negativi e le reazioni influenzate dagli inibitori della PCR, dall'impostazione errata del saggio o da un problema del reagente o dello strumento.

controllo senza amplificazione (NAC, No Amplification Control)	Vedere pozzetti IPC bloccati a controllo negativo.
controllo senza templatato (NTC, No Template Control)	Vedere controllo negativo (NC, Negative Control).
curva di dissociazione	Vedere curva di melting.
curva di melting	Visualizzazione dei dati acquisiti durante la fase della curva di melting. I picchi nelle curva di melting possono indicare la temperatura di melting (T_m) del target o possono identificare un'amplificazione della PCR non specifica. È possibile visualizzare la curva di melting come reporter normalizzato (R_n) rispetto alla temperatura o come reporter derivativo ($-R_n'$) rispetto alla temperatura.
curva standard	<p>Negli esperimenti con curva standard e curva standard relativa:</p> <ul style="list-style-type: none">• La linea meglio adeguata in un plot dei valori C_T provenienti dalle reazioni standard riportate rispetto alle quantità standard. Vedere anche linea di regressione.• Un set di standard contenenti un range di quantità note. I dati provenienti dalle reazioni di curva standard vengono utilizzati per la generazione della curva standard. La curva standard viene definita dal numero di punti nelle serie, dal numero dei replicati standard, dalla quantità di partenza e dal fattore seriale. Vedere anche serie di diluizioni standard.
delta R_n (ΔR_n)	Abbreviazione per reporter normalizzato baseline-corrected.
design wizard	Funzione del software StepOne™ che aiuta nell'impostazione di un esperimento, indicando le migliori scelte da eseguire dal momento dell'immissione del disegno dell'esperimento.
diluyente	Reagente utilizzato per la diluizione di un campione o di uno standard prima di aggiungerlo alla reazione della PCR. Può essere rappresentato da acqua o da un buffer (soluzione tampone).
DNA campione (10X)	Componente della reazione visualizzato sulla schermata Reaction Setup (Impostazione reazione). Il software presuppone che il DNA del campione aggiunto alla miscela di reazione sia a una concentrazione 10X. Ad esempio, se il volume della reazione è 20 μ l, il volume calcolato del campione per la reazione 1 è di 2 μ l.
EFF%	Vedere efficienza di amplificazione (EFF%).

efficienza di amplificazione (EFF%)	<p>Calcolo dell'efficienza dell'amplificazione della PCR. L'efficienza di amplificazione viene calcolata utilizzando la pendenza della linea di regressione nella curva standard. Una pendenza vicina a $-3,3$ indica un'efficienza di amplificazione PCR ottimale, del 100%. Fattori che influenzano l'efficienza di amplificazione:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Range delle quantità degli standard - Per misurazioni dell'efficienza più accurate e precise, utilizzare un range di quantità degli standard ampio, da 5 a 6 log (da 10^5 a 10^6 volte). • Numero di replicati degli standard- Per misurazioni dell'efficienza più accurate, includere i replicati per diminuire gli effetti delle inesattezze relative al pipettaggio. • Inibitori della PCR - La presenza di inibitori della PCR nella reazione può ridurre l'efficienza di amplificazione.
esperimento	<p>Si riferisce all'intero processo di esecuzione di una sessione utilizzando il sistema StepOne™, includendo impostazione, esecuzione e analisi. I tipi di esperimenti eseguibili utilizzando il sistema StepOne™ sono:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Quantificazione – curva standard • Quantificazione – curva standard relativa • Quantificazione - C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) • Curva di melting • Elaborazione di genotipi • Presenza/Assenza
esperimento end-point	<p>Esperimento in cui i dati sulla fluorescenza acquisiti in una lettura post-PCR vengono utilizzati per calcolare i risultati per gli esperimenti di genotipizzazione o di presenza/assenza.</p>
fase	<p>Componente del profilo termico. Una fase consiste di uno o più passaggi.</p>
fase ciclica	<p>Fase nel profilo termico che viene ripetuta. Se per eseguire la PCR viene utilizzata la fase ciclica, questa viene denominata fase di amplificazione.</p>
fase della curva di melting	<p>Fase nel profilo termico con un incremento della temperatura per la generazione di una curva di melting.</p>
fase di sosta	<p>Fase nel profilo termico che include uno o più passaggi. È possibile, ad esempio, aggiungere una fase di sosta al profilo termico per attivare enzimi, inattivare enzimi o incubare una reazione.</p>
fattore di diluizione.	<p>Vedere fattore seriale.</p>
fattore seriale	<p>Valore numerico che definisce la sequenza delle quantità nella curva standard. Il fattore seriale e la quantità di partenza vengono utilizzati per il calcolo della quantità standard per ogni punto nella curva standard. Ad esempio, se la curva standard viene definita con un fattore seriale di 1:10 o 10, la differenza tra 2 punti adiacenti nella curva viene decuplicata.</p>
file informazioni del saggio (AIF, Assay Information File)	<p>File dati su CD spedito insieme a ogni ordine di saggi. Il nome del file include il numero del codice a barre presente sulla piastra. Le informazioni presenti nell'AIF sono fornite in un formato delimitato da tabulazioni.</p>

forward primer	Oligonucleotide all'estremità 5' del target. Reverse primer e forward primer vengono utilizzati insieme nelle reazioni PCR per l'amplificazione del target.
gene di riferimento	Vedere controllo endogeno.
gruppo di replicati	Set di reazioni identiche in un esperimento.
ID refSNP	Numero che identifica l' ID del cluster di riferimento SNP (refSNP). Generato dal Single Nucleotide Polymorphism Database of Nucleotide Sequence Variation (dbSNP). Può essere utilizzato per ricercare nello Store di Applied Biosystem un SNP Genotyping Assay di Applied Biosystems. Noto anche come Numero rs.
ID saggio	Valore assegnato da Applied Biosystems a TaqMan® Gene Expression Assays e TaqMan® SNP Genotyping Assays.
impostazione avanzata	Funzione nel software StepOne™ che consente l'impostazione degli esperimenti in base al proprio disegno.
intercetta y	Coefficiente di regressione calcolato dalla linea di regressione nella curva standard. L' intercetta y indica il ciclo (C_T) atteso per un campione con quantità uguale a 1 (ad esempio, 1 ng/μl).
IPC	Abbreviazione per controllo positivo interno (IPC, Internal Positive Control). Inoltre, in esperimenti di presenza/assenza, l'operazione per il target IPC nei pozzetti che contengono un template IPC.
IPC+	Richiesta di presenza/assenza quando il controllo positivo interno (IPC) è riuscito.
IPC bloccato	In esperimenti di presenza/assenza, l'operazione assegnata al target IPC in pozzetti che contengono un'agente bloccante IPC invece di un template di campione. Vedere anche pozzetti IPC bloccati a controllo negativo.
layout piastra	Illustrazione della griglia di pozzetti 6 × 8 del contenuto assegnato nella piastra di reazione. Nel software, è possibile utilizzare il layout piastra come strumento di selezione per assegnare il contenuto dei pozzetti, per visualizzare le assegnazioni dei pozzetti e per visualizzare i risultati. Il layout piastra viene visualizzato nelle schermate del Design Wizard, in quelle di Advanced Setup (Impostazioni avanzate) e in quelle delle esecuzioni e delle analisi. Il layout piastra può essere stampato, incluso in un report, esportato e salvato come slide per una presentazione.
lettura end-point	Vedere lettura post-PCR.
lettura post-PCR	Utilizzata negli esperimenti di genotipizzazione e di presenza/assenza, la parte della sessione analitica dello strumento che si verifica dopo l'amplificazione. Negli esperimenti di genotipizzazione, i dati sulla fluorescenza acquisiti durante la lettura post-PCR vengono visualizzati nel plot di discriminazione allelica e utilizzati per fare richieste di alleli. Negli esperimenti di presenza/assenza, i dati sulla fluorescenza acquisiti durante la lettura post-PCR vengono visualizzati nel plot di presenza/assenza e utilizzati per fare richieste di rilevamento. Chiamata anche lettura end-point.

lettura pre-PCR	Utilizzata negli esperimenti di genotipizzazione e di presenza/assenza, la parte della sessione analitica dello strumento che si verifica prima dell'amplificazione. I dati sulla fluorescenza acquisiti durante la lettura pre-PCR vengono utilizzati per normalizzare i dati sulla fluorescenza post-lettura.
libreria campioni	Acquisizione di campioni nel software StepOne™. La libreria campioni contiene il nome e il colore del campione.
libreria saggi SNP	Acquisizione di saggi SNP nel software StepOne™.
libreria target	Acquisizione di target nel software StepOne™.
linea di base	Nel plot di amplificazione, linea adeguata ai livelli di fluorescenza per un range definito di cicli. In caso di utilizzo dell'impostazione di analisi con linea di base manuale, per la determinazione della linea di base Applied Biosystem consiglia di selezionare cicli precoci della PCR.
linea di base automatica	Impostazione di analisi in cui il software calcola i valori di inizio e di fine della linea di base per il plot di amplificazione. Il software utilizza la linea di base e la soglia per calcolare il ciclo soglia (C_T).
linea di base manuale	Impostazione di analisi in cui vengono immessi i valori di inizio e di fine della linea di base per il plot di amplificazione. Il software utilizza la linea di base e la soglia per calcolare il valori del C_T .
linea di regressione	Negli esperimenti con curva standard e curva standard relativa, la migliore linea adeguata alla curva standard. Formula della linea di regressione: $C_T = m [\log (Qtà)] + b$ dove m rappresenta la pendenza, b l'intercetta y e Qtà la quantità standard. Vedere anche coefficienti di regressione.
metodo C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$)	Metodo di quantificazione per esperimenti di quantificazione. Con il metodo C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$), vengono utilizzati i risultati provenienti da un campione di riferimento e da un controllo endogeno per determinare le quantità relative di un target nei campioni.
metodo della curva standard	Metodo di quantificazione per esperimenti di quantificazione. Con il metodo della curva standard, vengono utilizzati i risultati provenienti dagli standard per determinare le quantità relative di un target nei campioni.
metodo della curva standard relativa	Metodo di quantificazione per esperimenti di quantificazione. Con il metodo della curva standard relativa, vengono utilizzati i risultati provenienti dagli standard, da un campione di riferimento e da un controllo endogeno per determinare le quantità relative di un target nei campioni.
miscela di primer	Componente della reazione PCR contenente il forward primer e il reverse primer disegnati per amplificare il target.
metodo di esecuzione	Definizione del volume della reazione e del profilo termico per la sessione analitica dello strumento.

metodo di quantificazione	Con gli esperimenti di quantificazione, il metodo utilizzato per determinare la quantità di target nei campioni. Per gli esperimenti di quantificazione, esistono tre tipi di metodi di quantificazione disponibili: curva standard, C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) e curva standard relativa.
miscela di reazione	Soluzione contenente tutti i componenti necessari per eseguire la reazione PCR, ad eccezione del template (campione, standard o controllo).
miscela primer/sonda	Componente della reazione PCR che consiste nei primer disegnati per amplificare il target e una sonda TaqMan [®] disegnata per rilevare l'amplificazione del target.
miscela sonda	Componente della reazione PCR contenente una sonda TaqMan [®] disegnata per rilevare l'amplificazione del target.
monitoraggio remoto	Funzione software che consente la visualizzazione dello stato di uno strumento in rete, l'invio di esperimenti allo strumento e il download degli esperimenti eseguiti al proprio computer.
nome dell'esperimento	Imnesso durante l'impostazione dell'esperimento, il nome che viene utilizzato per identificare l'esperimento. I nomi degli esperimenti non possono superare i 100 caratteri e non possono includere alcuno dei seguenti caratteri: slash (/), backslash (\), maggiore di (>), minore di (<), asterisco (*), punto interrogativo (?), virgolette ("), linea verticale (), due punti (:) o punto e virgola (;).
numero rs	Vedere ID refSNP.
ometti pozzetto	Azione che viene eseguita dopo l'analisi per omettere uno o più pozzetti da tutte le analisi prima di analizzare nuovamente i dati.
operazione	Tipo di reazione eseguita nel pozzetto per il target o il saggio SNP. Le operazioni disponibili negli esperimenti del sistema StepOne [™] sono: <ul style="list-style-type: none"> • Sconosciuta • Controllo negativo • Standard (esperimenti di curva standard e curva standard relativa) • Controllo positivo (esperimenti di genotipizzazione) • IPC (esperimenti di presenza/assenza) • IPC bloccato (esperimenti di presenza/assenza)
outlier	Per un gruppo di dati, datapoint significativamente più piccolo o più grande rispetto agli altri.
passaggio	Componente del profilo termico. Un passaggio viene definito dalla temperatura, dal tempo, dalla rampa e dallo stato di acquisizione dei dati. Per le fasi cicliche, un passaggio viene anche definito dallo stato Auto Δ .
PCR in tempo reale	Procedura di acquisizione di dati sulla fluorescenza durante l'amplificazione della PCR. I dati della PCR in tempo reale vengono utilizzati per calcolare i risultati per gli esperimenti di quantificazione o per risolvere i problemi dei risultati per gli esperimenti di genotipizzazione o di presenza/assenza.

pendenza	Coefficiente di regressione calcolato dalla linea di regressione nella curva standard. La pendenza indica l'efficienza dell'amplificazione PCR per il saggio. Una pendenza di $-3,3$ indica un'efficienza di amplificazione del 100%. Vedere anche efficienza di amplificazione (EFF%).
plot della temperatura	Visualizzazione delle temperature per il campione, il pannello di copertura dello strumento e il blocco dello strumento durante la sessione analitica dello strumento.
plot di amplificazione	Visualizzazione dei dati acquisiti durante la fase ciclica dell'amplificazione della PCR. È visualizzabile come: <ul style="list-style-type: none"> • Reporter normalizzato baseline-corrected (ΔR_n) rispetto al ciclo • Reporter normalizzato (R_n) rispetto al ciclo • Ciclo soglia (C_T) rispetto al pozzetto
plot di discriminazione allelica	Visualizzazione dei dati acquisiti durante la lettura post-PCR. Il plot di discriminazione allelica è una manifestazione grafica del segnale del reporter normalizzato proveniente dalla sonda dell'allele 1, riportato rispetto al segnale del reporter normalizzato proveniente dalla sonda dell'allele 2.
plot dati non elaborati	Visualizzazione dell'ampiezza della fluorescenza per i pozzetti selezionati per tutti i filtri. Visualizza l'ampiezza della fluorescenza proveniente da tutti i datapoint acquisiti nella sessione analitica.
plot multicomponente	Visualizzazione dei dati acquisiti durante la fase ciclica della PCR in tempo reale. Il plot multicomponente mostra la fluorescenza per tutti i cicli nella sessione analitica.
pozzetti IPC a controllo negativo	In esperimenti di presenza/assenza, i pozzetti che contengono un template IPC e buffer o acqua invece di un template di campione nella reazione PCR. Solo il template IPC dovrebbe amplificarsi nei pozzetti IPC a controllo negativo, in quanto la reazione non contiene template di campione. Vedere anche IPC+.
pozzetti IPC bloccati a controllo negativo	In esperimenti di presenza/assenza, i pozzetti che contengono agente bloccante IPC invece di un template di campione nella reazione PCR. Nei pozzetti IPC bloccati a controllo negativo non deve verificarsi alcuna reazione di amplificazione in quanto la reazione non contiene alcun template di campione e l'amplificazione dell'IPC è bloccata. Chiamati anche Controllo senza amplificazione (NAC, No Amplification Control)
profilo termico	Parte del metodo di esecuzione che specifica temperatura, tempo, rampa e punti di acquisizione dati per tutti i passaggi e le fasi della sessione analitica dello strumento.
punto	Uno standard in una curva standard. La quantità di standard per ogni punto nella curva standard viene calcolato in base alla quantità di partenza e al fattore seriale.
quantità	Negli esperimenti di quantificazione, la quantità di target presente nei campioni. La quantità assoluta può riferirsi al numero di copie, alla massa, alla molarità o alla carica virale. La quantità relativa si riferisce a n volte la differenza tra la quantità normalizzata di target nel campione e la quantità normalizzata di target nel campione di riferimento.
quantità di partenza	Quando viene definita una curva standard o una serie di diluizioni standard, corrisponde alla quantità maggiore o minore.

quantità standard	<p>Quantità nota nella reazione PCR.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Negli esperimenti con curva standard, la quantità nota di target. Le unità per la quantità standard possono essere per la massa, il numero di copie, la carica virale o altre unità per la misurazione della quantità di target. • Negli esperimenti con curva standard relativa, quantità nota nello standard. Ad esempio, la quantità nota può riferirsi alla quantità di cDNA o alla quantità di stock. Le unità non sono rilevanti per gli esperimenti di curva standard relativa in quanto si annullano nei calcoli.
quantità normalizzata	Quantità di target divisa per la quantità di controllo endogeno.
quencher	<p>Molecola legata all'estremità 3' delle sonde TaqMan® per impedire che il reporter emetta un segnale fluorescente quando la sonda è intatta. Con i reagenti TaqMan®, è possibile utilizzare come quencher il quencher non fluorescente-minor groove binder (NFQ-MGB). Con i reagenti SYBR Green, non viene utilizzato alcun quencher.</p> <hr/> <p>IMPORTANTE! Applied Biosystems non consiglia l'uso del colorante TAMRA™ come reporter o quencher con il sistema StepOne™.</p> <hr/>
quencher non fluorescente-minor groove binder (NFQ-MGB)	<p>Molecole legate all'estremità 3' delle sonde TaqMan®. Quando la sonda è intatta, il quencher non fluorescente (NFQ) impedisce l'emissione del segnale di fluorescenza al colorante del reporter. L'NFQ non è fluorescente e quindi, producendo minori segnali di background, porta a una migliore precisione nella quantificazione. La minor groove binder (MGB) aumenta la temperatura di melting (T_m) senza aumentare la lunghezza della sonda. Consente inoltre il disegno di sonde più corte.</p>
QuickStart (Avvio rapido)	Funzione nel sistema StepOne™ che consente l'esecuzione dell'esperimento senza immettere le informazioni relative alle impostazioni della piastra.
Rn	Abbreviazione per reporter normalizzato.
rampa	<p>La velocità con cui cambia la temperatura durante la sessione analitica dello strumento. Ad eccezione del passaggio della curva di melting, la rampa viene definita da valore percentuale. Per il passaggio della curva di melting, la rampa viene definita da un incremento di temperatura. Nella visualizzazione grafica del profilo termico, la rampa viene indicata da una linea diagonale.</p>
reagenti	<p>I componenti della reazione PCR che vengono utilizzati per amplificare il target e per rilevare l'amplificazione. Tipi di reagenti utilizzati sul sistema StepOne™:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reagenti TaqMan® • Reagenti SYBR® Green • Altri reagenti
Reagenti SYBR® Green	Componenti della reazione PCR che consistono in due primer disegnati per amplificare il target e un colorante SYBR® Green per il rilevamento del DNA a doppia elica.
Reagenti TaqMan®	Componenti della reazione PCR che consistono nei primer disegnati per amplificare il target e una sonda TaqMan® disegnata per il rilevamento dell'amplificazione del target.

reazione campione/saggio SNP	Combinazione di campione e saggio SNP in una reazione PCR. Ogni reazione PCR può contenere un solo campione e un solo saggio SNP.
reazione campione/target	Combinazione di campione e saggio target in una reazione PCR. Nel Design Wizard, ogni reazione PCR può contenere un solo campione e un solo saggio target.
replicati	Numero totale di reazioni identiche contenenti componenti identici e volumi identici.
reporter	Colorante fluorescente utilizzato per rilevare l'amplificazione. Se si utilizzano reagenti TaqMan [®] , il colorante reporter viene collegato all'estremità 5'. Se si utilizzano reagenti SYBR [®] Green, il colorante reporter è il colorante SYBR [®] Green.
reporter derivativo (-Rn')	Visualizzato nell'asse y della curva di melting. Il segnale di reporter derivativo è il primo-derivativo negativo della fluorescenza normalizzata proveniente dal reporter.
reporter normalizzato (Rn)	Segnale della fluorescenza proveniente dal colorante del reporter, normalizzato al segnale della fluorescenza del riferimento passivo.
Reporter normalizzato baseline-corrected (ΔRn)	La grandezza del segnale di fluorescenza normalizzato generato dal reporter durante l'amplificazione della PCR. $\Delta Rn = Rn$ (endpoint) – Rn (linea di base), dove $Rn =$ reporter normalizzato.
reverse primer	Oligonucleotide all'estremità 3' del target. Reverse primer e forward primer vengono utilizzati insieme nelle reazioni PCR per l'amplificazione del target.
riferimento passivo	Colorante che produce un segnale fluorescente. Dal momento che il segnale di riferimento passivo deve essere uniforme per tutti i pozzetti, viene utilizzato per normalizzare il segnale del colorante del reporter per rispondere delle fluttuazioni di fluorescenza provocate dalle differenze minori in concentrazioni o volume esistenti da pozzetto a pozzetto. La normalizzazione al segnale di riferimento passivo consente una elevata precisione dei dati.
rifiuta pozzetto	Azione eseguita dal software durante l'analisi per rimuovere uno o più pozzetti dall'esecuzione di ulteriori analisi se al pozzetto è applicato un indicatore specifico.
saggio	Nel sistema StepOne [™] , una reazione PCR che contiene i primer per l'amplificazione di un target e un reagente per il rilevamento del target amplificato.
saggio SNP	Utilizzato negli esperimenti di genotipizzazione, reazione PCR che contiene i primer per l'amplificazione di un SNP e due sonde per il rilevamento di alleli diversi.
saggi inventariati	TaqMan [®] Genomic Assays prodotti precedentemente, che hanno passato le specifiche del controllo di qualità e sono conservati nell'inventario.
saggi prodotti su richiesta	TaqMan [®] Genomic Assays che vengono prodotti al momento dell'ordine. Solo i saggi che superano le specifiche del controllo di qualità della produzione vengono spediti.

sconosciuti	<p>Negli esperimenti di quantificazione, l'operazione per il target nei pozzetti che contengono un template di campione con quantità target sconosciute.</p> <p>Negli esperimenti di genotipizzazione, l'operazione per il saggio SNP nei pozzetti che contengono un template di campione con un genotipo sconosciuto.</p> <p>Negli esperimenti di presenza/assenza, l'operazione per il target nei pozzetti che contengono un template di campione in cui la presenza del target non è nota.</p>
serie	Vedere serie di diluizioni standard.
serie di diluizioni standard	Negli esperimenti con curva standard e curva standard relativa, un set di standard contenenti un range di quantità note. La serie di diluizioni standard viene preparata da standard diluiti serialmente. Ad esempio, lo soluzione standard stock viene utilizzata per preparare il primo punto di diluizione, il primo punto di diluizione viene utilizzato per preparare il secondo punto di diluizione e così via. I volumi necessari per la preparazione di una serie di diluizioni standard vengono calcolati dal numero di punti di diluizione, dal numero dei replicati standard, dalla quantità di partenza, dal fattore seriale e dalla concentrazione standard nello stock. Vedere anche curva standard.
SNP	Abbreviazione per polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) L'SNP può consistere nella differenza di una base o in un indel (da insertion/deletion, cioè inserimento/soppressione)
soglia	Il livello di fluorescenza al di sopra della linea di base ed entro l'area di crescita esponenziale del plot di amplificazione. È possibile determinare la soglia automaticamente (vedere C_T automatico) o impostarla manualmente (vedere C_T manuale).
standard	Campione che contiene quantità di standard note. Le reazioni standard vengono utilizzate negli esperimenti di quantificazione per la generazione di curve standard. Vedere anche curva standard e serie di diluizioni standard.
target	La sequenza di acido nucleico che si desidera amplificare e rilevare.
template	Tipo di acido nucleico da aggiungere alla reazione PCR. Il template raccomandato varia in base al tipo di esperimento.
temperatura di melting (T_m)	Punto nella curva di melting in cui i livelli della fluorescenza raggiungono il picco, ad indicare che il DNA a doppia elica amplificato si dissocia in DNA a singola elica.
tipo di esperimento	<p>I tipi di esperimenti eseguibili utilizzando il sistema StepOne™ sono:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Curva standard • C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) • Curva standard relativa • Curva di melting (non disponibile nel Design Wizard) • Elaborazione di genotipi • Presenza/Assenza <p>Il tipo di esperimento selezionato influenza le schermate di impostazione, di esecuzione e di analisi.</p>

Tm	Abbreviazione per temperatura di melting (Tm).
touchscreen	Display a sfioramento dello strumento per il controllo dello strumento stesso.
trascrittasi inversa	Componente della reazione PCR che converte l'RNA in cDNA. La trascrittasi inversa viene aggiunta alla reazione PCR per eseguire il passaggio 1 della RT-PCR.
Valore R²	Coefficiente di regressione calcolato dalla linea di regressione nella curva standard. Il valore R ² indica la vicinanza di accordo tra la linea di regressione della curva standard e i datapoint del C _T individuale provenienti dalle reazioni standard. Un valore di 1,00 indica un perfetto accordo tra la linea di regressione e i datapoint.
velocità di rampa	Velocità alla quale si verifica la rampa di temperatura durante la sessione analitica dello strumento. Le velocità di rampa disponibili includono la Rapida e la standard.

A

- addestramento, informazioni su [x](#)
- altri reagenti fluorescenti [7](#)
- AMPNC, indicatore [103](#)
- analisi dell'esperimento
 - analisi [80](#)
 - flusso di lavoro [78](#)
 - linee guida [82](#), [88](#), [93](#), [96](#), [101](#), [104](#), [105](#), [108](#), [109](#)
 - omissione pozzetti [104](#)
 - per ulteriori informazioni [88](#), [93](#), [96](#), [101](#), [104](#), [106](#), [108](#), [109](#)
 - pubblicazione dei dati [97](#)
 - visualizzazione delle impostazioni di analisi [100](#)
 - visualizzazione schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) [89](#)
 - visualizzazione schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente) [106](#)
 - visualizzazione schermata QC Summary (Riepilogo CQ) [102](#)
 - visualizzazione schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati) [108](#)
 - visualizzazione schermata Standard Curve (Curva standard) [86](#)
 - visualizzazione tabella Well (Pozzetto) [94](#)
- analisi dell'esperimento
 - visualizzazione schermata Multiple Plots (Plot multipli) [85](#)
- Applied Biosystems
 - Assistenza tecnica [x](#)
 - contattare [x](#)
 - feedback clienti sulla documentazione [ix](#)
- Assistenza tecnica, contattare [x](#)
- ATTENZIONE, descrizione [xi](#)
- AVVERTENZA, descrizione [xi](#)
- avvio dell'esecuzione
 - configurazione co-locata [61](#)
 - configurazione indipendente [62](#)

B

- BADROX, indicatore [103](#)
- BLFAIL, indicatore [103](#)

C

- campioni
 - diluizioni [43](#)
 - impostazione [25](#)
 - istruzioni per il disegno [26](#)
 - reazioni campioni (sconosciute) [52](#)

- caricamento della piastra di reazione [58](#)
- categoria di installazione [xx](#)
- categoria sovraccarico di tensione (classificazione) [xx](#)
- configurazione co-locata
 - monitoraggio [65](#)
 - start up [61](#)
 - trasferimento dati [74](#)
- configurazione indipendente
 - monitoraggio [71](#)
 - monitoraggio remoto [69](#)
 - start up [62](#)
 - trasferimento dati [75](#)
 - trasferimento dati da remoto [74](#)
- controllo negativo, componente dell'esperimento [4](#)
- convenzioni del testo [vii](#)
- convenzioni utilizzate in questa guida [vii](#)
- creazione nuovo esperimento [13](#)
- C_T [96](#)
- CTFAIL, indicatore [103](#)

D

- dati
 - esperimento di esempio [7](#), [9](#), [80](#)
 - informazioni sull'acquisizione dei dati [2](#)
 - pubblicazione [97](#)
 - trasferimento [73](#)
- Design Wizard
 - elementi del software [13](#)
 - schermata Experiment Properties (Proprietà dell'esperimento) [16](#)
 - schermata Materials List (Elenco materiali) [35](#)
 - schermata Methods & Materials (Metodi e materiali) [18](#)
 - schermata Reaction Setup (Impostazione reazione) [29](#)
 - schermata Run Method (Metodo di esecuzione) [27](#)
 - schermata Samples (Campioni) [25](#)
 - schermata Standards (Standard) [22](#)
 - schermata Targets (Target) [20](#)
 - termine [38](#)
- diluizioni del campione
 - preparazione [43](#)
 - volumi calcolati [32](#), [43](#)
- disegno dell'esperimento
 - creazione nuovo [13](#)
 - elementi del software [13](#)
 - flusso di lavoro [12](#)
 - linee guida [17](#), [19](#), [23](#), [26](#), [28](#), [33](#), [37](#), [40](#)

- per ulteriori informazioni 17, 20, 22, 24, 27, 28, 34, 37, 40
- termine del flusso di lavoro del Design Wizard 38
- disegno dell'esperimento
 - definizione dei metodi e dei materiali. 18
 - definizione delle proprietà dell'esperimento 16
 - impostazione campioni 25
 - Impostazione degli standard 22
 - impostazione dei target 20
 - impostazione del metodo di esecuzione 27
 - istruzioni per il 22
 - ordinazione materiali 35
 - rivisualizzazione impostazione della reazione 29
- documentazione, correlata viii
- Download della piastra di reazione 73

E

- efficienza di amplificazione 24, 88
- elementi del software
 - Design Wizard 13
 - schermate di analisi 82
- ergonomica, sicurezza xxii
- esecuzione dell'esperimento
 - abilitazione delle impostazioni di notifica 59
 - avvio 61
 - avvisi 69
 - flusso di lavoro 56
 - linee guida 60
 - monitoraggio 64
 - per ulteriori informazioni 59, 69, 70
 - preparazione per 57
 - trasferimento dati 73
- esperimenti con curva standard
 - informazioni su 4
- esperimento di esempio
 - analisi 78
 - dati 9
 - descrizione 8
 - disegno 12
 - esecuzione 56
 - flusso di lavoro 10
 - nome 16
 - preparazione 42
- etichette di sicurezza, sugli strumenti xv
- EXPFAIL, indicatore 103

F

- feedback clienti, sui documenti Applied Biosystems ix
- flussi di lavoro
 - Avvio rapido 8, 113
 - esperimento di esempio 10
 - Esportazione/Importazione 8, 115
 - Impostazione avanzata 112
 - Templato 8, 114
- flussi di lavoro degli esperimenti ulteriori. Vedere flussi di lavoro.

- flusso di lavoro avvio rapido 8, 113
- flusso di lavoro del templato 8, 114
- flusso di lavoro esportazione/importazione 8, 115
- flusso di lavoro impostazione avanzata 7, 8, 19, 40, 52, 112
- funzionamento dello strumento, sicurezza xvi

G

Guida on-line. *Vedere* sistema Help (Guida)

H

HIGHSD, indicatore 103

I

- icone di pericolo. *Vedere* simboli di sicurezza, sugli strumenti
- impostazioni di analisi
 - avanzate 101
 - C_T 101
 - indicatore 101
 - linea di base 101
 - soglia 101
 - visualizzazione 100
- impostazioni di notifica 59
- indicatore 96
- indicatori
 - impostazioni di analisi 101
 - negli esperimenti con curva standard 103
- ipotesi assunte per l'uso della guida vii
- istruzioni per il disegno 22

L

- libreria 28
- linea di base
 - regolazione manuale 101
 - valori corretti 93
- linee guida
 - analisi 82, 88, 93, 96, 101, 104, 105, 108, 109
 - disegno 17, 19, 23, 26, 28, 33, 37, 40
 - esecuzione 60
 - preparazione 44, 47, 49, 52
 - sicurezza chimica xvii
 - sicurezza rifiuti chimici xix
 - smaltimento rifiuti chimici xix

M

- materiali di consumo 17
 - supportati 3
 - Vedere anche materiali necessari 3
- materiali necessari 43, 45, 48, 50
- messaggi di attenzione per l'utente, descritti viii

miscela di reazione
 volumi 48
 volumi calcolati 30
 monitoraggio dell'esecuzione
 configurazione co-locata 65
 configurazione indipendente 71
 schermata Amplification Plot (Plot di
 amplificazione) 66
 schermata Run Method (Metodo di esecuzione) 68
 schermata Temperature Plot (Plot temperatura) 67
 monitoraggio dell'esecuzioneconfigurazione
 indipendente (remoto) 69
 movimenti ripetitivi, sicurezza xxii
 MSDS
 come ottenerle xviii
 descrizione xviii
 MSDS, come ottenerle x

N

NOAMP, indicatore 103
 NOISE, indicatore 103
 norme
 EMC xxiii
 sicurezza xxiii
 norme di compatibilità elettromagnetica. *Vedere*norme
 EMC
 norme di sicurezza xxiii
 norme EMC xxiii
 NOSIGNAL, indicatore 103

O

OFFSCALE, indicatore 103
 omissione pozzetti 104
 ordinazione materiali 35
 outlier. Vedere omissione pozzetti.
 OUTLIERRG, indicatore 103

P

PCR multiplex 5, 20
 PCR singleplex 5, 20
 pericoli. *Vedere* sicurezza
 PERICOLO, descrizione xi
 piastra di reazione
 caricamento 58
 Download 73
 layout 38
 preparazione 50
 plot di amplificazione, tipico 93

pozzetti
 controllo negativo 26, 38, 50
 omissione 104
 sconosciuti 26, 38, 50
 selezione 84
 standard 26, 38, 50
 preparazione dell'esperimento
 diluizioni del campione 43
 flusso di lavoro 42
 linee guida 44, 47, 49, 52
 miscela di reazione
 preparazione 47
 per ulteriori informazioni 44, 49, 52
 piastra di reazione 50
 serie di diluizioni standard 45
 preparazione per l'esecuzione 57
 profili rifiuti, descrizione xix
 pubblicazione dei dati 97

R

reagenti
 altri fluorescenti 7
 SYBR Green 6
 TaqMan 6
 replicato, componente dell'esperimento 4
 rifiuti a rischio biologico, manipolazione xx
 rifiuti radioattivi, manipolazione xx
 rischi xxi
 risoluzione problemi
 indicatori 103
 omissione pozzetti 104
 regolazione linea di base 101
 regolazione soglia 101
 visualizzazione delle impostazioni di analisi 100
 visualizzazione schermata Multicomponent Plot (Plot
 multicomponente) 106
 visualizzazione schermata QC Summary (Riepilogo
 CQ) 102
 visualizzazione schermata Raw Data Plot (Plot dati
 non elaborati) 108
 risultati, interpretazione 79
 RT-PCR in 1 fase 20, 28, 33
 RT-PCR in 1 fasi 5
 RT-PCR in 2 fasi 5, 8, 19, 20
 Run Method (Metodo di esecuzione), libreria 28

S

saggi inventariati 33
 saggi personalizzati 33
 saggi prodotti su ordine 33
 schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione)
 monitoraggio durante una sessione di analisi 66
 visualizzazione dopo una sessione di analisi 89
 schermata Experiment Properties (Proprietà
 dell'esperimento) 16

- schermata Materials List (Elenco materiali) 35
- schermata Methods & Materials (Metodi e materiali) 18
- schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente) 106
- schermata Multiple Plots (Plot multipli) 85
- schermata QC Summary (Riepilogo CQ) 102
- schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati) 108
- schermata Reaction Setup (Impostazione reazione) 29
- schermata Run Method (Metodo di esecuzione) 27
monitoraggio durante una sessione di analisi 68
- schermata Sample (Campione) 25
- schermata Standards (Standard) 22
- schermata Targets (Target) 20
- schermata Temperature Plot (Plot temperatura) 67
- schermate di analisi
- elementi del software 82
 - schermata Amplification Plot (Plot di amplificazione) 89
 - schermata Multicomponent Plot (Plot multicomponente) 106
 - schermata Multiple Plots (Plot multipli) 85
 - schermata QC Summary (Riepilogo CQ) 102
 - schermata Raw Data Plot (Plot dati non elaborati) 108
 - schermata Standard Curve (Curva standard) 86
 - suggerimenti per la navigazione 84
 - tabella Well (Pozzetto) 94
- selezione pozzetti 84
- serie di diluizioni standard
- componente dell'esperimento 4
 - preparazione 45
 - volumi calcolati 31
- sicurezza
- chimica xvii
 - convenzioni xi
 - elettrica xx
 - ergonomico xxii
 - funzionamento dello strumento xvi
 - linee guida xvii, xix
 - movimenti ripetitivi xxii
 - norme xxiii
 - prima di mettere in funzione lo strumento xvi
 - rifiuti chimici xix
 - rischi biologici xxi
 - spostamento e sollevamento dello strumento xvi
 - spostamento/sollevamento xvi
 - stazione di lavoro xxii
- sicurezza chimica xvii
- sicurezza dalle sostanze chimiche xvii
- sicurezza della stazione di lavoro xxii
- sicurezza elettrica xx
- sicurezza rifiuti chimici xix
- simboli di pericolo. *Vedere* simboli di sicurezza, sugli strumenti
- simboli di sicurezza, sugli strumenti
simboli di pericolo. *Vedere* simboli di sicurezza, sugli strumenti
- simboli, sicurezza xiii
- sistema Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System. *Vedere* sistema StepOne.
- sistema Help (Guida), accesso ix
- sistema StepOne
- acquisizione dati 2
 - disposizione 61, 64, 74
 - filtri 109
 - materiali di consumo 3
 - reagenti 6
- smaltimento rifiuti, linee guida xix
- soglia
- regolazione manuale 101
 - valori corretti 93
- SPIKE, indicatore 103
- spostamento e sollevamento, sicurezza xvi
- stampa delle istruzioni di impostazione della reazione 32
- standard
- casella di controllo Set Up Standards (Imposta standard) 20, 22
 - componente dell'esperimento 4
 - diluizione 45
 - impostazione 22
 - istruzioni per il disegno 23
 - reazioni standard 51
- suggerimenti per la navigazione
- selezione pozzetti 84
 - visualizzazione plot multipli 85
- SYBR Green, reagenti 6, 19, 20, 22, 33, 109
- ## T
- tabella Well (Pozzetto) 94
- TaqMan, reagenti 6, 19, 20, 22, 33, 109
- target
- impostazione 20
 - istruzioni per il disegno 22
- templato. *Vedere* i campioni.
- THOLDFAIL, indicatore 103
- trasferimento dati 73
- ## U
- utilizzo della guida
- come tutorial 7
 - per i propri esperimenti 7
- ## V
- velocità di rampa 18, 19

Worldwide Sales and Support

Applied Biosystems vast distribution and service network, composed of highly trained support and applications personnel, reaches 150 countries on six continents. For sales office locations and technical support, please call our local office or refer to our Web site at www.appliedbiosystems.com.

Applied Biosystems is committed to providing the world's leading technology and information for life scientists.

Headquarters

850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404 USA
Phone: +1 650.638.5800
Toll Free (In North America): +1 800.345.5224
Fax: +1 650.638.5884

06/2010